

**Titre:** Validation d'un indice de la stabilité relative des sols par l'évaluation de l'activité enzymatique dans le contexte d'une contamination au cuivre  
**Title:**

**Auteur:** Marylène Dussault  
**Author:**

**Date:** 2006

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Dussault, M. (2006). Validation d'un indice de la stabilité relative des sols par l'évaluation de l'activité enzymatique dans le contexte d'une contamination au cuivre [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
**Citation:** <https://publications.polymtl.ca/7711/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/7711/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:**  
**Advisors:**

**Programme:** Non spécifié  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

VALIDATION D'UN INDICE DE LA STABILITÉ RELATIVE DES SOLS PAR  
L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LE CONTEXTE D'UNE  
CONTAMINATION AU CUIVRE

MARYLÈNE DUSSAULT

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

AVRIL 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-17939-0*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-17939-0*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

VALIDATION D'UN INDICE DE LA STABILITÉ RELATIVE DES SOLS PAR  
L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DANS LE CONTEXTE D'UNE  
CONTAMINATION AU CUIVRE

présenté par : DUSSAULT Marylène

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. ZAGURY Gérald, Ph.D., président

Mme DESCHÊNES Louise, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. SAUVÉ Sébastien, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. COURCHESNE François, PhD, membre



## Remerciements

J'aimerais remercier tellement de gens. Premièrement, je ne peux passer sous silence la contribution de ma directrice Louise Deschênes et de mon codirecteur Sébastien Sauvé. Louise j'apprécie ton honnêteté et ton humilité, ta patience et ta générosité. Je te remercie de m'avoir convoquée dans ton bureau en décembre 2002 et de m'avoir vendu avec enthousiasme la vie d'étudiante du cycle supérieur à l'école Polytechnique de Montréal, au sein du CIRAIG. Par cette rencontre, tu m'as permis d'évoluer dans un groupe merveilleux, de développer des habiletés essentielles pour ma future carrière, de rencontrer l'homme de ma vie et de trouver ma voie qui, étrangement, n'est pas la chimie. Sébastien, je te remercie pour ta patience, ta bonne humeur et ta passion pour la science qui, bien sûr, est communicatrice.

Un merci spécial à tout les gens que j'ai côtoyé au CIRAIG. Je ne peux malheureusement pas nommer tout le monde, mais j'aimerais souligner la contribution de Manon Leduc et de Valérie Bécaert. Manon pour sa gentillesse, son système D, son support technique et moral et sa joie de vivre. D'un point de vue personnel, merci Valérie de ton écoute, de ta fébrilité, de ta passion, de ton intégrité et de m'avoir montré qu'il est possible de vivre en équilibre entre l'art et la science. D'un point de vu professionnel, merci pour ton support, ta perspicacité, bref ton implication générale dans le projet. Merci aussi à tous ceux qui mon donné des conseils au cours de ma maîtrise : Olivier Gauthier PhD, Pierre Legendre PhD, Lucie Jean, Gérald Zagury PhD, Baptiste Mary, Sophie Chaperon, Julien Rachou, Carmen Donisa PhD, Catherine Reid,

encore une fois Valérie PhD et, bien sûr, Pascal PhD. Un merci spécial à Cécile Bulle pour son aide lors de la correction du mémoire. Ça a été grandement apprécié!!

Finalement, merci à ma famille, ma mère, mon frère et mon père, pour leur support. Merci à mes amis, entre autre à Carine, Cynthia, Edwige, Jean-Marc, Pierre et Éric, pour le support et les occasions de s’amuser. Merci à Télémaque pour l’équilibre mental qu’il m’apporte. Un immense merci à Pascal Lesage, mon amoureux, mon partenaire de vie, celui qui m’appuie à tous les niveaux, que j’aime et qui, en plus, a la capacité de corriger mon anglais et de soutenir des conversations d’ordre scientifique.

## Résumé

Les sols sont essentiels au maintien des fonctions des écosystèmes terrestres, ce qui implique que leur santé est déterminante pour la survie des organismes vivant dans ces écosystèmes. La dégradation de ce type d'habitat est un problème de première importance. Celle-ci peut être engendrée par divers polluants autant organiques qu'inorganiques. En particulier, le cuivre (Cu) présent dans les sols à certaines concentrations est l'un des polluants reconnus comme étant les plus toxiques pour les microorganismes. Celui-ci peut affecter les processus essentiels du sol, et ce pour de longues périodes. Dans la littérature, la nécessité de développer des indicateurs de la santé des sols a souvent été mentionnée. Le principal obstacle à l'élaboration de tels indicateurs est qu'ils doivent démontrer à la fois une sensibilité aux faibles variations dans les fonctions des sols et une capacité à distinguer les variations de nature anthropogénique (e.g. effet d'un contaminant) des variations naturelles.

L'activité enzymatique est souvent considérée comme un indice sensible pour l'évaluation de la santé des sols. Par contre, l'hétérogénéité des mesures de l'activité enzymatique a soulevé plusieurs questions quant aux limites de cet indice. Une des limitations principales est l'effet du pH sur les propriétés édaphiques. L'influence du pH est d'autant plus problématique dans le contexte d'une contamination par un métal comme le cuivre que le pH influence à la fois l'activité enzymatique et la spéciation du métal. Ceci engendre des difficultés liées à la validité écologique des mesures et à la comparaison des résultats avec ceux provenant d'autres études.

Les objectifs de cette étude sont : (1) de valider l'indice RSSI (*Relative Soil Stability Index*) dans le contexte d'une contamination au cuivre des sols; (2) de vérifier la capacité de l'indice à découpler l'impact du cuivre sur l'activité enzymatique des changements engendrés naturellement par les propriétés du sol (e.g. le pH); et (3) d'évaluer la sensibilité du RSSI à distinguer entre différentes concentrations de cuivre dans les sols.

Vu la complexité des relations édaphiques, ce projet de recherche a utilisé un sol naturel de base (sable limoneux; pH=5,6; 27 g MO/kg sol sec) dont seules quelques caractéristiques ont été modifiées. Un design factoriel à trois facteurs fixes (MO, pH, Cu) a été conceptualisé, résultant en 18 échantillons. Dans un premier temps, de la mousse de tourbe a été utilisée pour ajuster le contenu en MO du sol de base pour atteindre une palette de concentrations, soit 27 g MO/kg sol sec, 57 g MO/kg sol sec et 78 g MO/kg sol sec. Ensuite, du  $\text{CaCO}_3$  a été ajouté pour neutraliser une partie des sols traités. Finalement, une contamination par l'ajout d'une solution de  $\text{CuCl}_2$  a été effectuée pour certains des échantillons, suivie par trois cycles de séchages-mouillages et par une lixiviation des sols. Les concentrations de cuivre choisies sont 250 et 750 mg de Cu/kg de sol sec, soit des concentrations de cuivre total représentant les plages situées entre les critères B-C et C-2C ,respectivement, pour les sols contaminés au cuivre selon la réglementation en place au Québec .

Dans ce projet de recherche, l'impact d'une perturbation thermique (17h, 60°C) sur l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase d'un sol a été évalué pour une période de

quatre jours. Les tests enzymatiques ont été effectués sans tampon. En plus, certaines propriétés chimiques des sols (pH, carbone organique dissous (COD), cuivre soluble, activité du cuivre libre ( $pCu^{2+}$ )) ont été mesurées avant la perturbation thermique et cinq jours après celle-ci. Les résultats du suivi de l'activité enzymatique ont été utilisés pour calculer des scores RSSI, un indice de santé des sols qui permet de quantifier la stabilité relative des fonctions essentielles du sol. L'indice RSSI est en effet déterminé en calculant le ratio entre l'activité enzymatique (suivie dans le temps) des sols perturbés et des sols non-perturbés, ce qui permet d'intégrer les concepts de résistance et de récupération des sols, qui sont des caractéristiques clés des écosystèmes.

Les résultats des RSSI ont été analysés statistiquement par une ANOVA factorielle et les relations entre l'activité des enzymes et les propriétés chimiques mesurées ont été approfondies à l'aide d'une analyse de composantes principales (PCA). Afin de répondre aux hypothèses de normalité et d'homogénéité de la variance, les résultats des sols contaminés à 750 mg/kg sol sec ont été rejetés.

Les enzymes, la  $\beta$ -glucosidase et la protéase, ont été choisies sur la base de leur importance écologique et de la simplicité des essais. En effet, la  $\beta$ -Glucosidase est considérée comme une enzyme clé dans le cycle biogéochimique du carbone : elle dégrade les hydrates de carbone et assure l'approvisionnement en nutriments pour la croissance des organismes hétérotrophes des sols. Par ailleurs, la protéase est une enzyme impliquée dans le cycle de l'azote (c'est une enzyme cinétiquement limitante du processus de minéralisation de l'azote).

Les résultats ont confirmé que le pH est une propriété dominante dans les sols. Les valeurs de  $pCu^{2+}$  et du contenu en COD étaient significativement plus élevées pour les sols ayant un pH plus alcalin, tandis que les concentrations de cuivres solubles dans les solutions de sols étaient plus importantes en pH acide.

D'autre part, la perturbation thermique appliquée au sol a affecté la concentration en COD et en Cu dissous. En effet, pour tous les échantillons la concentration en COD (en moyenne  $10,21 \pm 2,70$  mg/L) a augmenté suite à la perturbation thermique (augmentation pouvant atteindre 113%). Cette augmentation du contenu en COD dans la solution de sol suite à la perturbation thermique peut s'expliquer par la solubilisation des débris organiques provenant des microorganismes détruits par la perturbation. En ce qui concerne les variations de concentration observées pour le Cu soluble, en général, les différences de concentration du Cu soluble causées par la perturbation sont assez faibles. Une exception notable est l'échantillon de sol acide ayant la concentration la plus faible de MO dissoute et étant contaminé à 750 mg Cu/kg sol sec : le cuivre soluble de ce sol est affecté négativement par la perturbation thermique passant de  $5,2 \pm 0,1$  mg de Cu/L à  $3,94 \pm 0,06$  mg de Cu/L. Finalement, l'activité du cuivre libre n'a subi aucun changement suite à la perturbation.

Les résultats de l'activité des enzymes seules (sols non perturbés) n'ont pas pu être reliés à l'activité du cuivre libre ( $pCu^{2+}$ ), une propriété intégratrice des propriétés chimiques du sol (e.g. pH et MO), et de la teneur en cuivre du sol. Afin d'approfondir les relations entre les propriétés chimiques et l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la

protéase, une analyse des composantes principales (PCA) a été réalisée. Le PCA a montré un effet dominant du pH. En effet, le pH est corrélé (-0.95) avec le facteur 1 (qui représente 47% de la variabilité totale), comme le sont la majorité des propriétés : COD (-0.85);  $pCu^{2+}$  (-0.87); l'activité de la  $\beta$ -glucosidase (0.70); et l'activité de la protéase (-0.84). En somme, la forte dépendance au pH des différentes propriétés du sol rend la détection de l'impact du Cu sur l'activité enzymatique pratiquement impossible.

Le suivi de l'activité enzymatique simultanée des sols perturbés et non-perturbés dans le temps a permis d'observer que les variations journalières de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase étaient similaires entre les sols perturbés et non-perturbés.

L'effet de la perturbation thermique sur les deux enzymes étudiées dans le temps est différent. L'activité de la  $\beta$ -glucosidase est réduite d'environ 50% suite à la perturbation, pour les sols non-contaminés, et demeure à ce niveau pour toute la période du suivi. Au contraire, la perturbation thermique a stimulé l'activité de la protéase dans le sol non-contaminé dès la deuxième journée après la perturbation, atteignant jusqu'à 2,5 fois l'activité du sol non-perturbé correspondant. Cette stimulation est probablement associée à l'augmentation de la concentration du COD. En effet, le bris du matériel organique sous la chaleur augmente la solubilisation de substances organiques de structures simples (e.g. matériel cellulaire), soit une source facilement assimilable par les microorganismes du sol, ce qui résulte souvent en une augmentation de l'activité enzymatique.

Par contre, la présence de cuivre dans le sol semble avoir inhibé le processus enzymatique normal de la protéase, car son activité dans les sols contaminés n'a pas été stimulée suite à l'application de la perturbation thermique. Le calcul du RSSI permet de quantifier cette observation. Par exemple, pour le sol neutre ayant le plus fort contenu en MO, le RSSI de l'échantillon non-contaminé est de 143,2% tandis que les RSSI calculés pour l'échantillon contaminé à 250 mg de Cu/kg de sol sec est de 54,0%. Ainsi, la présence du cuivre n'a pas seulement inhibé la stimulation, mais a réduit l'activité de la protéase.

Les résultats de l'ANOVA ont montré que la présence de cuivre a eu un impact significatif sur tous les RSSI calculés à partir de l'activité de la protéase. Par contre, les résultats ANOVA des RSSI de la  $\beta$ -glucosidase n'ont pas montré de différence significative pour tous les sols entre les échantillons contaminés et non contaminés.

L'analyse des relations entre l'activité des enzymes et les propriétés chimiques étudiées a été approfondie par PCA. Ceci a permis de mettre en évidence que les scores RSSI sont indépendants du pH pour les deux enzymes (orthogonalité des vecteurs représentant le RSSI et le pH). De plus, les vecteurs du RSSI de la  $\beta$ -glucosidase et de la MO étant en opposition, il existe une corrélation négative entre ces variables. Pourtant, sans l'utilisation du RSSI, l'activité de la  $\beta$ -glucosidase n'était que peu corrélée à la MO (-0.56 par rapport au facteur 3), ceci étant dû probablement à l'effet prépondérant du pH. Finalement, le PCA montre que le RSSI basé sur la protéase est corrélé aux différentes formes du cuivre. En effet, le vecteur du RSSI basé sur la



protéase est en opposition avec les vecteurs du cuivre total et du cuivre soluble et semble corrélé au vecteur du  $pCu^{2+}$ .

L'étude permet de conclure que le RSSI de la protéase semble être un bon indicateur de la santé des sols contaminés par le cuivre, contrairement à celui de la  $\beta$ -glucosidase qui, du fait de sa forte corrélation à la matière organique du sol, semblerait mieux adaptée pour l'évaluation de l'impact des traitements des sols en milieu agricole. Par ailleurs, les résultats RSSI des deux enzymes se sont révélés indépendants du pH. Ainsi, l'utilisation du RSSI pourrait offrir une alternative à l'utilisation de tampons, qui engendrent divers problèmes dans les tests enzymatiques, tout en s'affranchissant des problèmes liés au pH. Par conséquent, l'outil pourrait permettre la comparaison entre les résultats provenant de sols ayant des propriétés chimiques et des activités intrinsèques différentes, car c'est un indice relatif. Pour toutes ces raisons, les résultats présentés dans ce projet permettent de conclure qu'un indice basé sur la stabilité fonctionnelle du sol, comme le RSSI, semble être une voie prometteuse pour évaluer l'impact des polluants ou d'autres sources de stress anthropogéniques sur la santé des sols.

Finalement, l'objectif de ce projet a été partiellement atteint. En effet, le RSSI s'est montré indépendant de la propriété dominante des sols étudiés, i.e. le pH, et le RSSI basé sur l'activité de la protéase a démontré être capable de détecter la présence du cuivre. Cependant, le RSSI de la  $\beta$ -glucosidase ne s'est pas révélé adéquat comme indicateur de l'impact du cuivre sur la santé des sols. De plus, le rejet des résultats à 750

mg de Cu/kg de sol sec a empêché de vérifier si le RSSI des enzymes pouvait être sensible aux différentes concentrations de cuivre dans les sols.

## **Abstract**

Soils are essential for maintaining terrestrial ecosystems' functions, and their health is therefore a determinant factor for the survival of living organisms in these ecosystems. The degradation of this type of habitat is a major problem. This degradation can be brought upon by pollution, either of the organic or inorganic type. In particular, the presence of copper (Cu) in soils at certain concentrations is well known to be particularly toxic for microorganisms. Copper can affect essential soil processes, effects which can last for long periods of time. In the literature, the necessity to develop soil health indicators has often been mentioned. The principal obstacle to the elaboration of such indicators is that they must both be sensitive to slight variations in soil functions and have the capacity to distinguish between anthropogenic variations (e.g. effects of a contaminant) and natural variations.

Enzyme activity is often considered a sensitive indicator for evaluating soil health. However, the heterogeneity of enzyme activity measurements has cast doubts as to the limits of such an indicator. One of the principal limitations is the effect of pH on edaphic properties. The influence of pH is even more problematic in the context of a metal contamination, such as copper contamination, since pH influences both enzyme activity and metal speciation. This results in complications in determining the ecological validity of measurements and in the comparison of results with those of other studies.

The objectives of this research project are: (1) to validate the Relative Soil Stability Index (RSSI) as an indicator of the impact of a soil copper contamination on soil health; (2) to verify the capacity of the RSSI to decouple the impact of copper on enzyme activity and that of naturally occurring soil properties (e.g. pH); and (3) to evaluate the ability of the RSSI to distinguish between different soil copper concentrations.

Given the complexity of edaphic relations, this research project used a natural base soil (loamy soil; pH=5.6; 27 g MO/kg dry soil), for which only a few characteristics were modified. A factorial experimental design of 3 fixed factors (SOM, pH, Cu content) was chosen, resulting in 18 final soils. First, peat moss was used to adjust the base soil SOM content to obtain three concentrations: 27 g MO/kg dry soil; 57 g MO/kg dry soil; and 78 g SOM/kg dry soil. Next,  $\text{CaCO}_3$  was added to neutralise a subset of the treated soil. Finally, some of the treated soils were contaminated by adding a  $\text{CuCl}_2$  solution, followed by three wetting and drying cycles and a soil leaching phase. The chosen copper concentrations were 250 and 750 mg Cu/kg dry soil: the former represents the middle value between soil quality criteria B and C from applicable Quebec regulations for copper contaminated sites, while the latter represents a middle value between the C criteria and twice the C criteria.

In this research project, the impact of a heat perturbation on the soils'  $\beta$ -glucosidase and protease activity were evaluated over a four-day period. Potential enzyme activity analysis was carried out without using a buffer. Certain soil chemical properties (pH, dissolved organic carbon (DOC), and free copper activity ( $\text{pCu}^{2+}$ )) were also measured

both before and 5 days after the heat perturbation. The results of the enzyme activity measurements over time were used to evaluate Relative Soil Stability Index (RSSI) scores, a soil health indicator that quantifies the relative stability of essential soil functions. A RSSI score is determined by calculating the ratio between the enzyme activity over a given time period in a perturbed soil and that in the same but unperturbed soil. This allows the integration of the concepts of resistance and recuperation in soils, which are key characteristics of ecosystems.

RSSI results were analyzed by ANOVA factorial analysis, and the relationships between the RSSI scores and chemical soil properties were submitted to further investigation using principal component analysis (PCA). In order to respect the hypotheses of normality and homogeneity across variance of the tests, the results of the 750 mg/kg dry soil were rejected.

The enzymes (i.e.  $\beta$ -glucosidase and protease) were chosen on the basis of their ecological importance and of the simplicity of the measurement of their activity. The  $\beta$ -glucosidase enzyme is considered key in the biogeochemical carbon cycle: it degrades carbohydrates and ensures the supply of nutrients for the growth of heterotrophic organisms in soil. Protease, for its part, is involved in the nitrogen cycle: in fact, it is a kinetically limiting enzyme for the nitrogen mineralization process.

The results confirmed that pH is indeed a dominant soil property. The values of  $pCu^{2+}$  and of DOC were significantly higher for the more alkaline soils, whereas soluble copper concentrations in soil solutions were higher for the acidic soils.

The heat perturbation affected both DOC and soluble Cu. Indeed, the DOC of all samples (average of  $10.21 \pm 2.70$  mg/L) rose after the heat perturbation, with increases of up to 113%. This DOC increase in the soil solution can be explained by the solubilisation of organic debris resulting from the destruction of microorganisms by the heat perturbation. In regards to the observed variations in soluble Cu concentrations, no clear tendency was discerned. Generally, the differences in soluble Cu concentrations caused by the heat perturbation were rather weak. One notable exception is the 750 mg Cu/kg dry soil, acidic and low SOM soil sample: this soil's soluble copper concentration was negatively affected by the heat perturbation, dropping from  $5.2 \pm 0.1$  mg Cu/L to  $3.94 \pm 0.06$  mg Cu/L. Finally, the free copper ion activity was not affected by the perturbation.

Free copper activity ( $pCu^{2+}$ ) is an integrative property of soil chemical properties (e.g. pH and SOM). The results of the enzyme activities in themselves could not be linked to  $pCu^{2+}$ . In order to obtain a better understanding of the relations between chemical properties and enzyme activity, a principal component analysis was carried out. The PCA showed that pH effects dominate. The pH is correlated (0.95) with the first factor (representing 47% of the total variability), as are the other properties: DOC (-0.85);  $pCu^{2+}$  (-0.87);  $\beta$ -glucosidase activity (-0.70); and protease activity (-0.84). Overall, the high dependence of the different soil properties to pH makes the detection of the impact of Cu on enzyme activity practically impossible.

It was observed that, when simultaneously monitoring in time the enzyme activity in both perturbed and unperturbed soils, daily variations in  $\beta$ -glucosidase activity were similar for both soils.

The effect over time of the heat perturbation was different for both considered enzymes. In the case of  $\beta$ -glucosidase, the activity dropped by approximately 50% following the heat perturbation for uncontaminated soils, and stayed at this level for the duration of the monitoring period. On the other hand, the heat perturbation actually stimulated protease activity in the uncontaminated soils starting the second day after perturbation. These stimulated enzyme activities reached up to 2.5 times that of the corresponding non-perturbed soils. This stimulation is probably attributable to an increase in DOC. Indeed, the break down of organic matter at high temperatures increases the solubility of organic material with simple structures (e.g. cellular material), which is easily available to soil microorganisms, resulting in an increase in enzyme activity.

However, the presence of copper in soil seems to have inhibited the normal enzyme process of protease, since its activity in contaminated soil was not stimulated after a heat perturbation. The calculation of RSSI scores allowed the quantification of this observation. For example, in the neutral soil with a high SOM content, the RSSI score of the uncontaminated soil is 143%, while that of the soil contaminated at 250mg Cu/kg dry soil is 54%. It can therefore be seen that not only did the presence of Cu inhibit the stimulation, it actually reduced protease activity.

The ANOVA results show that the presence of copper had a significant impact on all RSSI scores calculated for protease activity. However, the ANOVA results for the RSSI scores calculated using  $\beta$ -glucosidase show significant differences for all soils between contaminated and uncontaminated samples.

The relationships between the RSSI scores and chemical soil properties were submitted to further investigations using PCA. The PCA results clearly show that RSSI scores are independent from pH (the RSSI and pH vectors are orthogonal). Moreover, the relative position of the RSSI vector based on  $\beta$ -glucosidase activity and that of SOM show that these two variables are very strongly negatively correlated. Without the use of RSSI, this negative correlation was not seen: indeed, the  $\beta$ -glucosidase activity was only weakly correlated to SOM (-0.56 in relation to factor 3), probably due to the preponderant effect of pH. Finally, the PCA shows that RSSI scores based on protease activity is correlated to the different forms of copper. Indeed, the vector representing protease RSSI is opposed to that of total and soluble copper and close with that of  $pCu^{2+}$ .

It can be concluded from this research project that RSSI based on protease activity is a good indicator of the health of copper contaminated soil, contrary to the RSSI based on  $\beta$ -glucosidase activity. The latter, however, because of its strong correlation to SOM, may be better adapted as an indicator of the impact of agricultural soil treatments. Moreover, the RSSI scores based on both types of enzymes proved to be independent from soil pH. Therefore, the use of RSSI could be an alternative to the use of buffers,



which is laden with problems when evaluating enzyme activity. Consequently, this type of indicator, being relative in nature, may allow the comparison of results from soils having different chemical properties and intrinsic activities. For all these reasons, it is possible to conclude from the results of this research project that indicators based on soil functional stability, such as the RSSI, are a promising avenue for the evaluation of the impact of pollution of other anthropogenic stresses on soil health.

Finally, the objectives of the research project were partially met. The RSSI indeed proved to be independent from the dominant soil property (i.e. soil pH) and the RSSI based on protease activity proved to be able to detect the presence of copper contamination in soil. However, the RSSI based on  $\beta$ -glucosidase was shown to be an inadequate indicator of the impact of copper on soil health. Also, by rejecting the results of the soils contaminated at 750 mg Cu/kg dry soil, it was impossible to test whether this type of indicator is sensitive to the concentration of copper in the soils.

## Table des matières

<b>Remerciements.....</b>	<b>iv</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>xxi</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>xxv</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>Liste des annexes.....</b>	<b>xxxiv</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>xxxv</b>
<b>Chapitre 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Problématique .....	1
1.2 Hypothèse et objectifs.....	5
1.2.1 Hypothèse de recherche .....	5
1.2.2 Objectifs .....	5
<b>Chapitre 2 Revue de la littérature.....</b>	<b>6</b>

2.1	Les sols.....	6
2.1.1	Composition des sols.....	9
2.1.2	Propriétés physiques.....	10
2.1.3	Propriétés chimiques .....	15
2.1.4	Propriétés biologiques.....	20
2.2	Dégradation des sols .....	21
2.2.1	Contaminants métalliques .....	23
2.2.2	Le cuivre.....	26
2.3	Indice pour détecter la dégradation des sols .....	31
2.3.1	Indicateurs basés sur les propriétés physiques et chimiques.....	32
2.3.2	Indicateurs basés sur les propriétés biologiques .....	33
2.3.3	Activité enzymatique .....	40
2.3.4	Indicateur de la stabilité fonctionnelle des sols.....	45
<b>Chapitre 3</b>	<b>Approche méthodologique.....</b>	<b>52</b>
<b>Chapitre 4</b>	<b>L'utilisation d'une approche basée sur la stabilité fonctionnelle (RSSI) pour évaluer l'impact du cuivre sur la santé des sols .....</b>	<b>59</b>

4.1	Présentation de l'article.....	59
4.2	Use of an enzyme activity-based stability index (RSSI) to evaluate the impact of copper on soil health.....	61
4.2.1	Abstract .....	61
4.2.2	Keywords .....	62
4.2.3	Introduction .....	62
4.2.4	Materials and methods .....	68
4.2.5	Results and discussion.....	75
4.2.6	Conclusion.....	91
4.2.7	Acknowledgements .....	92
4.2.8	References .....	93
<b>Chapitre 5</b>	<b>Résultats complémentaires .....</b>	<b>101</b>
5.1	Propriétés des sols.....	102
5.2	Effet de la perturbation sur l'activité de l'ion libre du cuivre ....	104
5.3	Effet de la perturbation sur la concentration en carbone organique dissous .....	108
5.4	Effet de la perturbation thermique sur le cuivre soluble .....	110

5.5	Effet de la perturbation thermique sur le pH .....	113
<b>Chapitre 6</b>	<b>Discussion générale.....</b>	<b>115</b>
6.1	Discussion des résultats .....	116
6.1.1	Les propriété chimiques .....	116
6.1.2	La perturbation thermique.....	117
6.1.3	L'activité enzymatique.....	119
6.2	Discussion méthodologique.....	125
6.2.1	Analyse de l'activité de l'arylsulfatase.....	125
6.2.2	Échantillons contaminés à 750 mg/kg de Cu .....	127
6.2.3	Entreposage et incubation .....	129
<b>Chapitre 7</b>	<b>Conclusions et recommandations.....</b>	<b>131</b>
7.1	Conclusions.....	131
7.2	Recommandations et perspectives .....	133
7.2.1	Recommandations méthodologiques .....	133
7.2.2	Perspectives.....	135
<b>Références.....</b>		<b>136</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>149</b>

## Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Paramètres microbiens utilisés pour tester l'écotoxicité du sol (McGrath <i>et al.</i> , 2002).....	35
Tableau 2.2 : Indices de résistance et de résilience (modifié de Orwin et Wardle, 2004) .....	48
Table 4.1 : Soil treatments identification .....	69
Tableau 5.1 : Propriétés physico-chimiques du sol de base.....	102
Tableau 5.2 : Propriétés chimiques des sols après les traitements .....	103
Tableau A1- 1 : Masse de sol sec à introduire selon l'échantillon.....	173
Tableau A1- 2 : Contamination des échantillons au cuivre. ....	175
Tableau A1- 3 : Horaire des manipulations reliées aux cycles mouillages et à la lixiation .....	177
Tableau A1- 4 : Identification des pots .....	186
Tableau A1- 5 : Paramètres analysés sur l'extraction à l'eau des échantillons .....	189
Tableau A1- 6 : Produit nécessaire à la préparation d'un litre de solution tampon mère.....	192
Tableau A2- 1 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales, avec les résultats de l'activité enzymatique des sols non-perturbés. ....	214

Tableau A2- 2 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la $\beta$ -glucosidase .....	215
Tableau A2- 3 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la $\beta$ -glucosidase .....	215
Tableau A2- 4 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la protéase .....	215
Tableau A2- 5 : Résultats de l'ANOVA factorielle sur les RSSI de la protéase .....	216
Tableau A2- 6 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales avec les résultats du RSSI de la $\beta$ -glucosidase. ....	217
Tableau A2- 7 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales avec les résultats du RSSI de la protéase.....	219
Tableau A3- 1 : Liste des tableaux regroupés sur le disque.....	221

## Liste des figures

Figure 2.1 : Figure simplifiée du cycle de la vie illustrant le rôle central du sol en tant que catalyseur du cycle du carbone, des nutriments et de l'énergie de l'écosphère. Modifié de (Doran, 2002).....	7
Figure 2.2 : Classes texturales des sols selon l'USDA, modifié de Vanloon 2000. ....	12
Figure 2.3 : Les multiples interactions et rétroactions entre les cinq principaux facteurs influençant la formation et la stabilisation des agrégats. Modifié de (Six, <i>et al.</i> , 2004). Les lignes pleines représentent les interactions et les lignes pleines les rétroactions. ....	19
Figure 2.4 : Étendue des zones de dégradation des sols sur la terre selon un recensement effectué en 1993 (UNEP, 2002).....	22
Figure 2.5 : Relation entre la performance des organismes exposés au métal et la concentration d'un métal essentiel, comme le cuivre, dans les sols. Modifié de Walker <i>et al.</i> , 2001.....	24
Figure 2.6 : Facteurs environnementaux déterminant l'exposition des métaux traces aux microorganismes des sols (Allen, 2002). Les métaux liés au sol (MéSur), aux ligands organiques (MéL <sub>org</sub> ), aux ligands inorganiques (MéL <sub>inorg</sub> ) et aux microbes (Mé-microbe) sont représentés dans les différentes phases du sol. ....	29
Figure 2.7 : Exemple de la résistance et la résilience d'un variable réponse suite à une perturbation. Figure tiré de (Orwin et Wardle, 2004). ....	47



- Figure 3.1 : Design expérimental des différents échantillons générés à partir du sol de base (M.O.= 27 g MO/kg sol sec, pH= 5,6) .....54
- Figure 3.2 : Représentation schématique des principales étapes de l'approche méthodologique adoptée .....55
- Figure 4.1: Relationship between enzyme activity and free Cu activity.  $\beta$ -Glucosidase (4.1-A) and protease (4.1-B) activities integrated over 4 days plotted against free copper activity ( $pCu^{2+}$ ). Squares represent acidic soil samples (*La*, *Ma*, *Ha*) and triangles represent neutral soil samples (*Ln*, *Mn*, *Hn*). The empty symbols represent the uncontaminated samples and the plain symbols the copper contaminated samples. Error bars represent standard deviation over 6 samples. ....77
- Figure 4.2 : Principal Component Analysis (PCA) on  $\beta$ -glucosidase and protease activities and soil chemical properties. Protease (Prot) and  $\beta$ -glucosidase (Glu) activities are represented as the area under the curve of the 4-days follow up. Copper species are represented by total copper (TCu), dissolved copper (DCu) and  $Cu^{2+}$  activity ( $pCu^{2+}$ ). Soil organic matter (SOM), pH and dissolved organic carbon (DOC) are also shown. ....79
- Figure 4.3 : Enzyme activity reaction to the application of heat-perturbation. Examples of enzyme activity curves for *Ha* (3-A and 3-B) and *Hn* (3-C and 3-D) are presented. Figures 4.3-A and 4.3-C show  $\beta$ -glucosidase monitoring over the 4 day period whereas figure 4.3-B and 4.3-D represent protease monitoring of the same soils respectively.  $\triangle$  symbols represent uncontaminated soil samples,  $\blacklozenge$

represent copper-contaminated soil samples, plain lines represent unperturbed samples whereas dashed lines represent perturbed samples. Error bars represent the standard deviation over 6 samples. ....82

Figure 4.4: Factorial ANOVA analysis of  $\beta$ -glucosidase activity (4.4-A) and protease activity (4.4-B). Soil samples *L*, *M*, *H* refer to SOM level 27 g OM/kg dry soil, 57 g OM/kg dry soil and 78 g OM/kg dry soil respectively, whereas *a* and *n* refer to pH level acidic and neutral respectively. Light bands represent uncontaminated samples; dark bands represent copper contaminated samples. Calculations were based on 6 and 5 replicates of the unperturbed and perturbed samples for  $\beta$ -glucosidase and protease, respectively. Different lower case letters refer to significant differences between Cu treatments at same SOM and pH. Different capital letters refer to significant differences between SOM levels at same pH. Stars refer to significant differences between pH levels.....85

Figure 4.5 : Principal Component Analysis (PCA) on RSSI glucosidase (5-A) and RSSI protease (5-B) activities and soil chemical properties. RSSI of protease (RSSI Pro) and RSSI of glucosidase (RSSI Glu) are presented. Copper species are represented by total copper (TCu), dissolved copper (DCu) and  $\text{Cu}^{2+}$  activity ( $\text{pCu}^{2+}$ ). Soil organic matter (SOM), pH and dissolved organic carbone (DOC) are also shown. ....90

Figure 5.1 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur l'activité du cuivre libre. Les bandes hachurées représentent l'activité, exprimée en  $\text{pCu}^{2+}$ , mesurée

avant la perturbation, et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : L=27 g MO/kg sol , M=57 g MO/kg sol sec, H=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats. ....105

Figure 5.2 : Effet de la perturbation thermique sur le carbone organique dissous (COD). Les bandes hachurées représentent la concentration en COD des extraits aqueux des sols, exprimée en mg/L, mesurée avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : L=27 g MO/kg sol sec, M=57 g MO/kg sol sec, H=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats. ....109

Figure 5.3 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur la concentration du cuivre soluble. Les bandes hachurées représentent la concentration en cuivre

soluble des extractions à l'eau des sols, exprimé en mg/L, mesurée avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : : *L*=27 g MO/kg sol sec , *M*=57 g MO/kg sol sec, *H*=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats. ....111

Figure 5.4 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur le pH. Les bandes hachurées représentent le pH des extractions à l'eau des sols mesuré avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : : *L*=27 g MO/kg sol sec , *M*=57 g MO/kg sol sec, *H*=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats. ....114

Figure A1- 1 : Design expérimental des différents traitements des sols.....172

Figure A2- 1 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA de l'activité enzymatique et des propriétés chimiques.....	213
Figure A2- 2 : Plan factoriel du PCA (1,3) de l'activité enzymatique et des propriétés chimiques .....	214
Figure A2- 3 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA des RSSI de l'activité de la $\beta$ -glucosidase et des propriétés chimiques .....	217
Figure A2- 4 : Plan factoriel du PCA (1,2) des RSSI de l'activité de la $\beta$ -glucosidase et des propriétés chimiques .....	218
Figure A2- 5 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA des RSSI de l'activité de la protéase et des propriétés chimiques.....	219
Figure A2- 6 : Plan factoriel du PCA (1,3) des RSSI de l'activité de la protéase et des propriétés chimiques.....	220
Figure A4- 1 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>La</i> dans le temps. ....	222
Figure A4- 2 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>Ln</i> dans le temps. ....	223
Figure A4- 3 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>Ma</i> dans le temps. ....	223
Figure A4- 4 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>Mn</i> dans le temps. ....	224
Figure A4- 5 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>Ha</i> dans le temps.....	224
Figure A4- 6 : Courbes d'activité de la $\beta$ -Glucosidase du sol <i>Hn</i> dans le temps.....	225
Figure A4- 7 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>La</i> dans le temps.....	225

Figure A4- 8 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>Ln</i> dans le temps. ....	226
Figure A4- 9 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>Ma</i> dans le temps. ....	226
Figure A4- 10 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>Mn</i> dans le temps. ....	227
Figure A4- 11 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>Ha</i> dans le temps. ....	227
Figure A4- 12 : Courbes d'activité de la protéase du sol <i>Hn</i> dans le temps. ....	228
Figure A4- 13 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol <i>Ln</i> dans le temps. ....	228
Figure A4- 14 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol <i>Ma</i> dans le temps. ....	229
Figure A4- 15 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol <i>Mn</i> dans le temps. ....	229
Figure A4- 16 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol <i>Hn</i> dans le temps. ....	230

## Liste des annexes

<b>Annexe 1. Protocoles expérimentaux .....</b>	<b>150</b>
<b>Annexe 2. Analyses statistiques .....</b>	<b>213</b>
<b>Annexe 3. Résultats bruts.....</b>	<b>221</b>
<b>Annexe 4. Courbes d'activité enzymatique .....</b>	<b>222</b>

### Liste des sigles et abréviations

ACP	Analyse des composantes principales
AF	Acides fulviques
AH	Acides humiques
ANOVA	Analyse de variance
CEA	Capacité d'échange anionique
CEC	Capacité d'échange cationique
COD	Carbone organique dissous
CRC	Capacité de rétention au champ
Cu	Cuivre
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DOC	Dissolved organic carbon
ISE	Électrode spécifique aux ions/ Ion selective electrode
M.O. ou MO	Matière organique
PCA	Principal component analysis
$pCu^{2+}$	Activité de l'ion libre du cuivre ( $= -\log_{10} a[Cu^{2+}]$ )
PPN	Production primaire nette



RSSI	Relative soil stability index
SOM	Soil organic matter

## **Chapitre 1      Introduction**

### **1.1 Problématique**

Le sol est une ressource essentielle à la survie de la majorité des espèces terrestres. Le sol permet entre autres d'assurer les cycles des nutriments et d'offrir un support à la croissance des végétaux. Ainsi, il est à la base de notre approvisionnement en nourriture. Il joue aussi un rôle crucial dans le maintien de la qualité de l'environnement. En effet, ses fonctions incluent la filtration, la dégradation, l'immobilisation et la détoxification des substances organiques et inorganiques qui pénètrent dans les sols. De plus, le sol a la capacité de tamponner les effets dommageables à son fonctionnement jusqu'à ce qu'un certain seuil soit atteint. Ceci est possible du fait de l'hétérogénéité du sol et de la multitude d'interactions et d'équilibres qui existent entre les diverses propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. D'un autre côté, ces étroites interactions produisent dans le sol des variations spatiales et temporelles qui peuvent être assez importantes. En effet, un changement dans une propriété engendre des changements dans plusieurs autres propriétés, créant une cascade de changements qui peuvent avoir un effet résultant d'augmentation ou même d'annulation par rapport à l'effet du changement initial (Stotzky, 1997). Cette dernière caractéristique des sols est à la base des difficultés d'évaluation de l'état de santé des sols. En pratique, il est difficile de différencier les variations des fonctions du sol d'origine naturelle de celles occasionnées par une perte de stabilité fonctionnelle des sols suite à un traitement ou à un mode de gestion quelconque (e.g. épandage de lisier

de porc, contamination métallique). Toutefois, lorsqu'un certain seuil est franchi, le sol se dégrade rapidement. Ainsi, lorsque les signes de dégradation de la santé des sols sont visibles, des dommages majeurs (e.g. un appauvrissement de la structure de la communauté microbienne) ont déjà eu lieu. Pour ces raisons, il est difficile d'établir des liens concrets entre les effets écotoxiques des contaminants en présence et les paramètres physico-chimiques des sols.

Le développement d'un indicateur de la santé des sols est urgent. Premièrement parce que le sol est une ressource finie et vitale. Deuxièmement, parce que l'activité humaine a déjà occasionnée la dégradation de 23% de toutes les terres utilisables de la planète (i.e. excluant les montagnes et les déserts) à un niveau affectant leur productivité (UNEP, 2002). De plus, les sols contaminés par les métaux sont de plus en plus abondants et particulièrement problématiques étant donné que les métaux sont des contaminants persistants. Notamment, le nombre de sols possédant des concentrations toxiques de cuivre est en croissance, principalement du fait de l'application commune de fumier contenant du cuivre dans les champs agricoles (Trevors et Van Elsas, 1997). Le défi est de développer un indicateur qui soit à la fois sensible aux faibles variations dans les fonctions du sol et qui soit capable de distinguer les variations naturelles de celles produites par la présence de contaminants. Pour cela, l'indicateur doit être intégrateur des différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols. Les organismes du sol et les paramètres biotiques sont potentiellement d'intéressants indicateurs de la qualité du sol. Par exemple, l'activité enzymatique des sols est un candidat idéal, principalement du fait du rôle central et crucial qu'elle joue dans les

processus de maintien de l'écosystème (Dick, 1997). Par contre, certains problèmes liés à son utilisation ont amené plusieurs auteurs à s'interroger sur ses limites et à remettre en question son utilisation (voir Bécaert et Deschênes, 2006 pour une revue). Par exemple, l'activité enzymatique d'un sol est étroitement liée au pH du sol : les variations de l'activité enzymatique observés lors d'un changement du pH dans le sol peuvent être plus importantes que les variations produites par la présence de contaminants (Smolders *et al.*, 2001). Le pH est une propriété qui limite beaucoup l'utilisation de l'activité enzymatique comme indicateur de l'impact d'un contaminant métallique sur les sols. Les effets du pH sont particulièrement problématiques pour trois raisons : 1) il contrôle la vitesse de la réaction enzyme-substrat, 2) il contrôle la spéciation du cuivre et 3) il contrôle la capacité d'adsorption de la matière organique. Pour contourner le premier problème (1), l'utilisation d'un tampon au pH optimal de la réaction enzyme-substrat est courante dans la littérature. Toutefois, l'utilisation du tampon engendre d'autres problèmes. En effet : (i) la présence de cuivre peut décaler la valeur du pH optimum de la réaction enzyme-substat, (ii) le pH optimum de la réaction varie en fonction du sol, de plus, pour un même sol, il peut varier spatialement et temporellement et (iii) les constituants chimiques du tampon peuvent affecter l'activité de l'enzyme ainsi que la spéciation du cuivre.

Récemment, un indicateur basé sur la stabilité fonctionnelle de l'activité des enzymes des sols, RSSI (Relative Soil Stability Index), a été proposé afin de contrer les problèmes liés à l'utilisation individuelle de l'activité enzymatique (Bécaert *et al.*, 2006b). La stabilité d'une fonction du sol (e.g. l'activité enzymatique) intègre la

capacité de la fonction à résister et à récupérer face à un stress. Les concepts de résistance et de récupération des fonctions des sols sont des caractéristiques fondamentales pour le maintien de la santé des sols. Ils ont été abordés par plusieurs auteurs (e.g. (Griffiths *et al.*, 2001; Orwin et Wardle, 2004; Seybold *et al.*, 1999). Par exemple, Degens *et al.* (2001) utilise la résistance de l'équitabilité catabolique des sols face à une perturbation physique (série de cycle séchage/mouillage et gel/dégel) dans le but d'évaluer la susceptibilité de la communauté microbienne aux perturbations. Leurs résultats suggèrent que l'instabilité de l'équitabilité catabolique, pour les sols où celle-ci est faible, pourrait être expliquée par une instabilité dans les processus microbiens subissant un stress. Ils dénotent toutefois que l'hypothèse est difficilement vérifiable, étant donné qu'un stress ou une perturbation affectent les propriétés physiques et chimiques du sol qui, elles, influencent indirectement les processus microbiens, en plus d'affecter directement l'équitabilité catabolique microbienne. Contrairement à l'approche utilisée par Degens *et al.* (2001), le RSSI prend en compte la résistance et la résilience des sols.

Le RSSI a été développé récemment (Bécaert, 2004) et sa diffusion au sein de la communauté scientifique est encore plus récente (Bécaert, *et al.*, 2006). L'outil a été validé dans le contexte d'une contamination organique (2,4-D) sur des sols reconstitués. Dans la présente étude, il est proposé de valider le RSSI dans le contexte d'une contamination par un métal, i.e. le cuivre, à partir d'un sol naturel (sable limoneux à vocation agricole) modifié (deux niveaux de pH, trois niveaux de matière organique) et artificiellement contaminé par ajout de  $\text{CuCl}_2$  (0, 250 et 750 mg de Cu /kg de sol sec).

## **1.2 Hypothèse et objectifs**

### **1.2.1 Hypothèse de recherche**

L'évaluation de la stabilité relative du potentiel de l'activité enzymatique (RSSI), suite à une perturbation thermique, permet de détecter l'impact d'une contamination au cuivre sur la stabilité de l'activité enzymatique de la protéase et de la  $\beta$ -glucosidase des sols et ce indépendamment du pH et du contenu en matière organique des sols étudiés.

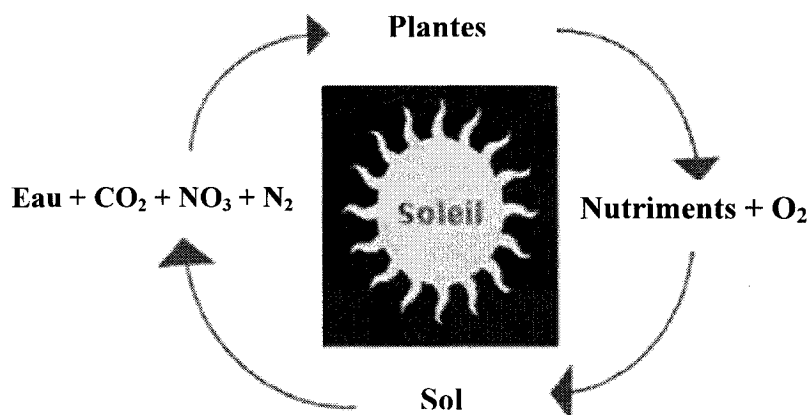
### **1.2.2 Objectifs**

- Valider l'utilisation d'un index basé sur la stabilité fonctionnelle relative des sols dans le contexte de l'évaluation de l'impact d'une contamination métallique (i.e. le cuivre) sur la santé des sols.
- Vérifier si l'approche proposée permet de départager l'impact du cuivre sur l'activité enzymatique des changements engendrés par les propriétés chimiques du sol (e.g. le pH), ceci dans l'optique de proposer éventuellement un indicateur alternatif de la santé des sols pouvant permettre une meilleure comparaison entre les résultats de différentes études.
- Évaluer la sensibilité de l'indice à distinguer entre différentes concentrations de cuivre dans les sols.

## **Chapitre 2      Revue de la littérature**

### **2.1   Les sols**

Au cours des dernières années, une idée de plus en plus reconnue scientifiquement est que le sol n'est pas une ressource inépuisable : mal utilisée ou mal gérée, cette ressource peut être perdue rapidement sans espoir de réhabilitation ou de régénération, (Nortcliff, 2002). Ce mouvement de pensée est porté principalement par une sensibilisation de la population quant au rôle central des sols dans le cycle de la vie. En effet, le sol est une composante d'une importance capitale pour la biosphère. Le sol permet notamment le maintien de la vie en recyclant les résidus organiques et biologiques en matières premières pour les plantes (dioxyde de carbone, nitrate, etc.). Un schéma simplifié du cycle de la vie sur lequel apparaît le rôle central joué par le sol dans le maintien de l'apport en éléments essentiels à la vie est présenté à la figure 2.1.



**Figure 2.1 : Figure simplifiée du cycle de la vie illustrant le rôle central du sol en tant que catalyseur du cycle du carbone, des nutriments et de l'énergie de l'écosphère. Modifié de (Doran, 2002)**

Les fonctions du sol ne se limitent pas à la production de nourriture et de fibres végétales, mais s'étendent aussi au maintien de la qualité de l'environnement global (Doran, 2002). Selon Nortcliff (2004), les fonctions de base des sols se regroupent en cinq catégories :

1. Fournir un support physique, biologique et chimique adéquat pour les organismes vivants.
2. Réguler et diviser les flux d'eau, entreposer et recycler les nutriments.
3. Soutenir l'activité biologique et la diversité pour la croissance des plantes et des animaux.
4. Filtrer, tamponner, dégrader, immobiliser et détoxifier les substances organiques et inorganiques.



5. Offrir un soutien mécanique pour les organismes vivants et leurs constructions.

Globalement, le sol est donc au centre de toutes les activités terrestres. De lui dépend en grande partie la survie des espèces terrestres et de leurs écosystèmes.

Pour ces différentes raisons, il y a eu beaucoup de questionnements afin de définir la santé ou la qualité d'un sol. Dans l'optique d'établir une gestion durable de cette ressource, le concept de qualité des sols ou de santé des sols est le sujet de nombreuses discussions au sein de la communauté scientifiques, des gouvernements et des gestionnaires de terrain. Notamment, le comité ad hoc sur la qualité des sols du *Soil Science Society of America* (S-581) a défini la qualité du sol comme étant «la capacité d'un sol en particulier à fonctionner, dans les limites de l'écosystème, à assurer la subsistance des plantes et la productivité animale, à maintenir et à assurer la qualité de l'eau et de l'air, et à supporter la santé et les habitations humaines» (Doran et Zeiss, 2000). Plus simplement, la qualité du sol peut être définie comme « la capacité du sol à fonctionner» (Karlen *et al.*, 1997). Il est plus facile de définir la qualité de l'eau et la qualité de l'air. La qualité de ces médias est définie presque entièrement selon l'impact négatif spécifique d'un nombre déterminé de polluants physiques, chimiques et biologiques et ce, dans un nombre de scénarios limités (Sojka et Upchurch, 1999). Le concept de qualité ou santé des sols est plus difficile à établir que celui de l'eau et de l'air étant donné que l'état pur du sol ne peut être défini. En effet, le sol est une matrice qui accumule autant les éléments naturels qu'anthropogéniques. Par exemple, la présence de cuivre peut être considérée comme de la pollution à certaines

concentrations, mais sa présence en tant que tel est souvent naturelle : le cuivre peut être, notamment, un constituant du matériel parental. De plus, le cuivre présent dans le sol à de faibles concentrations est un élément essentiel nécessaire à la vie au sein du sol. Bien que le terme *santé des sols* soit utilisé en général comme un synonyme de *qualité des sols* dans plusieurs études, incluant la présente (voir (Bécaert et Deschênes, 2006) pour une revue de la littérature sur le sujet), le terme *santé* est cependant préféré par certains, car il décrit le sol comme un système vivant et dynamique qui doit être protégé.

### **2.1.1 Composition des sols**

Les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols sont liées par de nombreuses interactions, ce qui rend l'étude des sols complexe (Six *et al.*, 2004). Le sol est une matrice hétérogène et les multiples associations et équilibres entre ses composantes entraînent une grande diversité de surfaces, permettant la formation de micro-habitats variés pour les organismes du sol (Stotzky, 1997). Par exemple, des agrégats de sable peuvent être enrobés partiellement ou totalement par une couche d'argile, d'oxyde d'aluminium, d'oxyde de manganèse ou de matière organique de nature variable, dont les charges sont dépendantes du pH. Différentes associations d'éléments physiques et chimiques modifient les propriétés d'adsorption des surfaces de contact, et créent des microenvironnements favorisant certaines réactions, mais favorisant également la présence de certains organismes. Cette hétérogénéité des facteurs abiotiques se reflète par conséquent dans l'hétérogénéité du microbiote : il est possible d'observer la présence simultanée, dans un même sol, de microbes

hétérotrophes et autotrophes, aérobies et anaérobies, de microbes ayant des tolérances différentes aux conditions ambiantes et extrêmes, etc (Stotzky, 1997).

Par ailleurs, les propriétés d'un sol donné vont présenter des variations temporelles : en plus des conditions climatiques, les cycles de la végétation ajoutent à l'hétérogénéité, ce qui contribue encore davantage à la formation de microenvironnements. Par conséquent, il n'existe pas deux échantillons de sol possédant la même communauté microbienne (Liesack *et al.*, 1997). Cette hétérogénéité caractéristique des sols représente la plus grande difficulté rencontrée lors d'études réalisées sur les sols.

Cette section se penche sur les trois grandes catégories de caractéristiques des sols : les propriétés physiques, chimiques et biologiques. Elles seront traitées séparément pour alléger le texte, bien que les dissocier ne rende pas justice à l'importance des interactions entre les différents constituants du sol.

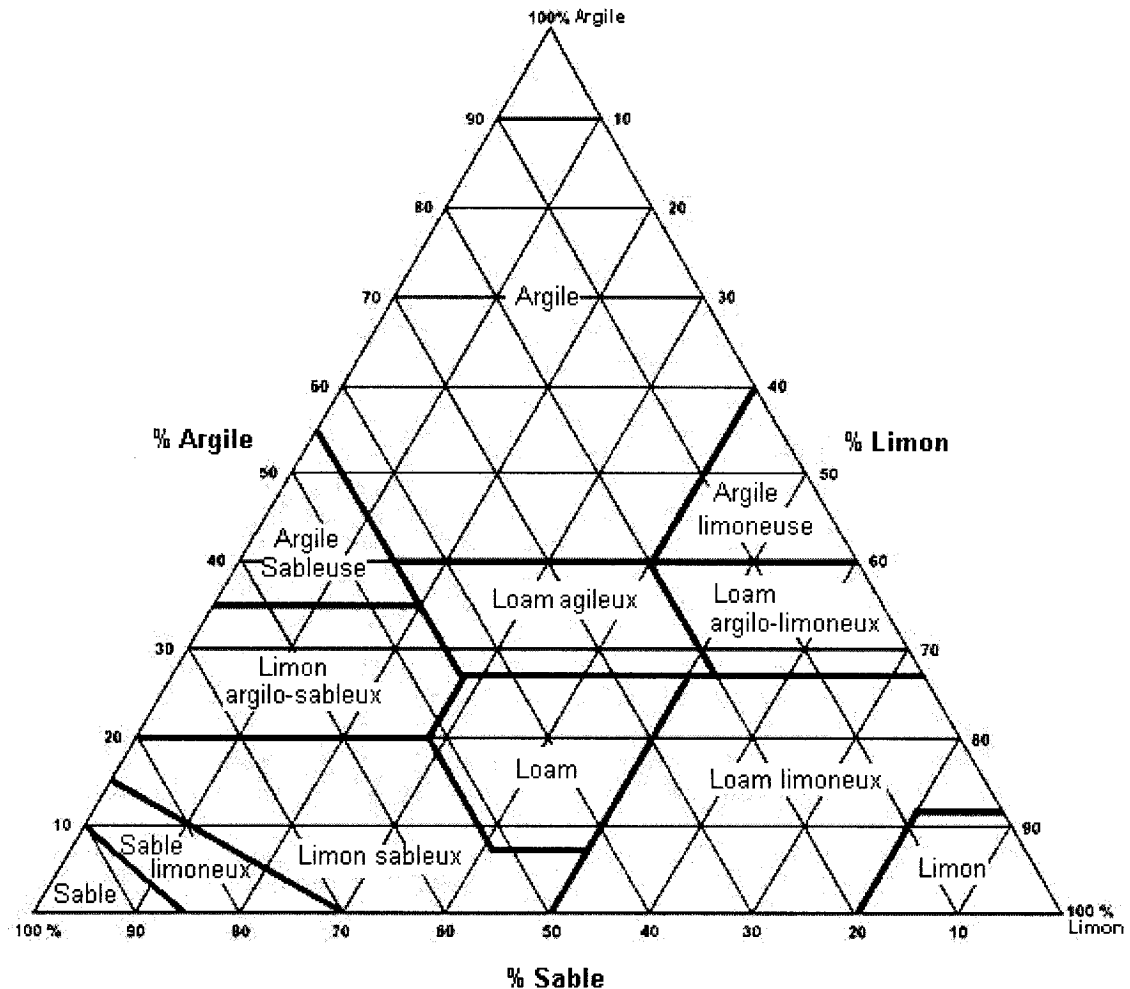
### **2.1.2 Propriétés physiques**

La formation d'un sol est initiée par des processus physiques chimiques et biologiques engendrant la dégradation de la roche en fines particules (ayant de plus grandes surfaces de contact). Certains éléments sont enrichis dans les sols comparativement leur concentration dans le matériel parental, notamment le carbone et l'azote dont certaines formes sont associées à la matière organique et aux organismes du sol (Sposito, 1989). Cinq facteurs influencent la pédogenèse des sols : le climat, la topographie, le matériel parental, le temps et les organismes vivants du sol (Jenny, 1941). Ainsi, les paramètres physiques du sol sont influents lors de sa formation. Les propriétés physiques du sol

incluent, entres autres, sa morphologie, la texture de ses particules, sa porosité, sa conductivité hydraulique et sa température. La texture du sol et sa porosité sont deux propriétés importantes dans le cadre de ce projet : elles vont influencer le choix du sol de base et elles seront utilisées pour mieux comprendre les sites de protection et les mécanismes de rétention de l'eau dans les sols. Pour cette raison, elles sont présentées de manière plus approfondie ci-dessous.

#### *2.1.2.1 Texture*

La texture du sol est définie à partir des pourcentages de particules appartenant aux trois classes granulométriques (sable, argiles et limons). Ces classes sont établies en fonction du diamètre des particules et peuvent être définies différemment selon les sociétés scientifiques. D'après l'USDA (United States Departement of Agriculture) la classification des particules est définie ainsi : le sable (entre 2mm et 50  $\mu\text{m}$ ), le limon (entre 50  $\mu\text{m}$  et 2 $\mu\text{m}$ ) et les argiles ( $<2\mu\text{m}$ ) (USDA, 2005). La figure 2.2 représente le triangle des textures des sols selon les classifications de l'USDA.



**Figure 2.2 : Classes texturales des sols selon l'USDA, modifié de Vanloon 2000.**

Les classes texturales sont importantes afin de classer les sols. La texture donne une idée de la pédogenèse d'un sol et de sa capacité à retenir les nutriments ou les contaminants. En effet, chaque type de particule a ses caractéristiques propres. Par exemple, il est facile de travailler avec du sable, il a une bonne capacité de drainage, il est bien aéré, mais il a une faible capacité de rétention de l'eau (Vanloon et Duffy, 2000). En général, plus les particules possèdent un diamètre faible (e.g. les argiles) plus leurs surfaces de contact sont importantes et présentent des interactions électrostatiques

fortes avec les autres composantes du sol. Ainsi, les nutriments et les polluants seront retenus davantage par un sol à texture fine que par un sol à texture plus grossière : la texture des sols influence donc la mobilité des nutriments et des polluants.

Les particules fines peuvent aussi offrir des sites de protection pour les enzymes du sol. Par exemple, les enzymes telles que les protéases et l'uréase, ainsi que leurs substrats, sont influencées par la présence d'argile et de composantes humiques du sol : une fois adsorbées par ces composantes du sol, elles peuvent être protégées de l'hydrolyse à laquelle sont soumises d'autres enzymes (Paul et Clark, 1996). Le fait que la capacité des sols à retenir certaines enzymes découle d'interactions électrostatiques implique une possibilité d'échanges lorsque des particules possédant de meilleures affinités électroniques sont présentes. Pour cette raison, il est habituellement question de capacité d'échange cationique (CEC) ou anionique (CEA), dépendamment de la nature des charges. Celles-ci sont parfois sujettes à l'influence du pH. Dans le cas des argiles, les charges sont habituellement négatives de par leur structure, mais les différences structurales des différents types d'argile influencent la force des liaisons avec lesquelles elles peuvent retenir les nutriments et l'eau. Par exemple, les argiles de structure 2 : 1, Si : Al (e.g. smectites) ont la capacité de retenir l'eau plus fortement que les argiles de structure 1 : 1 (e.g. kaolinite) (Stotzky, 1997). Ainsi, la capacité de rétention de l'eau d'un sol ne reflète pas adéquatement la quantité d'eau biodisponible pour les microorganismes, car la tension de l'eau peut être trop forte pour être accessibles au microorganisme (Stotzky, 1997). L'auteur souligne que les microorganismes fonctionnent de façon optimale lorsque le potentiel de l'eau dans les sols est de -33 kPa.

De plus, d'autres éléments que les argiles peuvent influencer la mobilité des nutriments et des contaminants dans les sols, comme le contenu en matière organique et les types de substances organiques (considérée comme des propriétés chimiques du sol) qui peuvent contribuer grandement à la CEC du sol. La polarité des la matière organique

#### *2.1.2.2 Porosité*

La porosité influence la capacité d'un sol à retenir l'eau et l'air, soit des éléments essentiels à la faune et la flore du sol. La porosité dépend d'une multitude de facteurs comme la texture du sol (section 2.1.2.1), sa structure, l'activité des organismes du sol et son contenu en matière organique ainsi que la nature de cette dernière (section 2.1.3.2). Les pores sont aussi des éléments déterminants pour la croissance et la localisation des populations microbiennes qui nécessitent de l'eau pour croître. En effet, l'eau est l'un des éléments les plus limitants pour les microorganismes dans les sols (Stotzky, 1997). La disponibilité de celle-ci est fortement liée au climat, mais surtout à la grosseur des pores du sol qui contrôle la pression due aux forces électrostatiques entre les composantes du sol et l'eau.

Le déplacement des microorganismes dans les sols à travers les pores est limité principalement par l'apport en eau dans les pores qui, lui, dépend en partie de la grosseur des pores (Prosser, 1997). Ainsi, un sol ayant plus de gros pores offre un meilleur habitat pour les microorganismes. Un sol ayant beaucoup de micropores peut avoir une grande capacité de rétention de l'eau, mais être un pauvre médium pour les

microorganismes. Les pores les plus favorables aux bactéries sont ceux ayant un diamètre de 0.8-3  $\mu\text{m}$  (Paul et Clark, 1996).

### **2.1.3 Propriétés chimiques**

Les paramètres chimiques des sols comportent entre autres : la composition des minéraux, la salinité, le pH, la forme et l'abondance des nutriments, la teneur en matière organique, les oxydes de fer, de manganèse et d'aluminium et la concentration en éléments potentiellement toxiques. Ces propriétés chimiques engendrent et influencent certaines caractéristiques importantes des sols comme : la capacité d'échange cationique et anionique, la capacité tampon du sol face à divers changements, la fertilité, etc.

Le pH et la matière organique (M.O.) sont souvent considérés comme des facteurs important dans les sols. Par exemple, selon la littérature, le pH, la M.O. et la quantité de cuivre total sont les facteurs qui ont la plus grande influence sur la concentration du cuivre soluble et, par conséquent, ce sont les paramètres qui contrôlent la mobilité et la biodisponibilité du métal (voir Sauvé *et al.*, 2000 pour une revue critique de la littérature).

#### **2.1.3.1 Le pH**

Le pH est un paramètre chimique du sol d'une importance capitale. Le pH affecte, entre autres, la solubilité, la disponibilité et la toxicité des éléments, la spéciation des métaux traces, la polarité des charges nettes sur les surfaces des matériaux amphotères et les charges négatives des matériaux ionisables. Par conséquent, le pH influence l'adsorption puis la liaison des nutriments et de la matière organique sur les parois



cellulaires des microorganismes, modifiant ainsi l'accessibilité des éléments essentiels à leur bioactivité (Stotzky, 1997). Le pH influence grandement la capacité d'échange cationique de la matière organique et des argiles. Certaines argiles ont des charges permanentes (indépendantes du pH), d'autres, comme la matière organique, ont des charges variables. La matière organique joue un rôle important en tamponnant la concentration à la fois des protons et des cations en solution (Sposito, 1989). De plus, dans le cas des sols contaminés aux métaux, le pH affecte à la fois la solubilité, la spéciation du métal (qui est reliée à la toxicité du métal) et le degré de complexation par les ligands (qui influence la disponibilité et la mobilité du métal) (Wuertz et Mergeay, 1997).

Au niveau de la structure microbienne, le pH joue aussi un rôle important. En effet, les mycètes sont prédominantes dans des sols acides ( $<5,5$ ), tandis que les bactéries dominent dans les sols neutres ou légèrement alcalins (Stotzky, 1997). En règle générale, un sol est considéré comme acide lorsque son pH est inférieur à 7,0 (Sposito, 1989). Globalement, le pH du sol influence une multitude de phénomènes faisant intervenir les divers constituants des sols, mais il est difficile d'en discuter de manière particulière du fait des nombreuses interactions entre les différents processus (Sauvé, 2002).

#### *2.1.3.2 Matière organique*

La matière organique (MO) se retrouve dans les sols à divers stades de décomposition. Les principales substances constituant la MO sont les substances humiques (acides

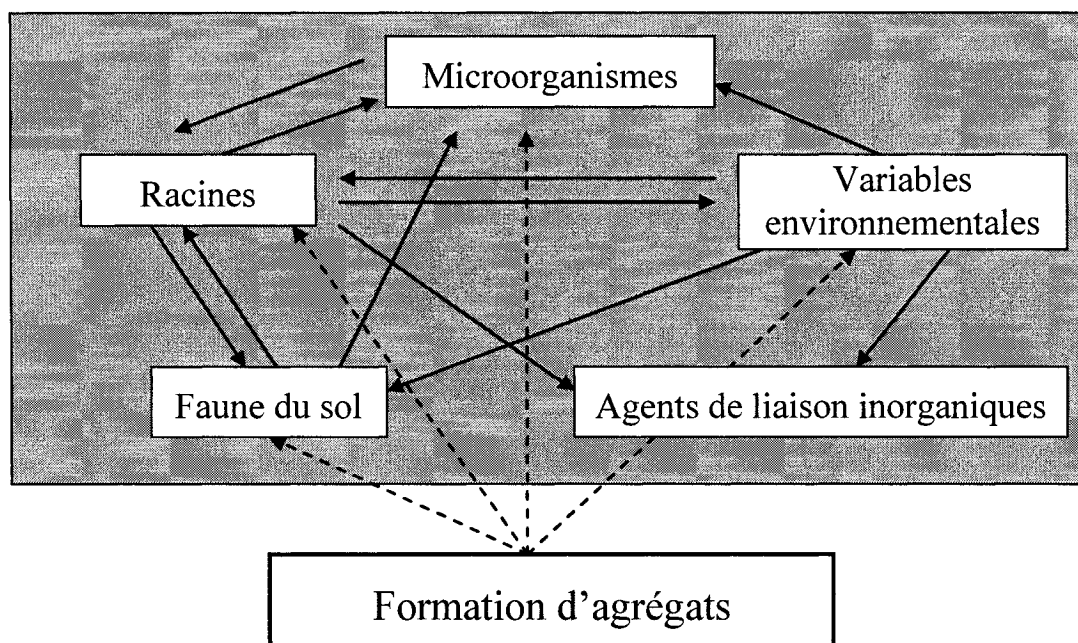
humiques, acides fulviques et humine), les saccharides, les peptides et les substances dérivées de matières récalcitrantes comme la lignine, les tannins, les longues molécules aliphatiques, etc (Clapp *et al.*, 2005). Les substances humiques sont des molécules complexes et possèdent une capacité d'absorption de l'eau pouvant atteindre 2 à 6 fois leur poids en eau. La matière organique offre une grande quantité de sites d'échange cationique (Balasoïu *et al.*, 2001). Bien que la proportion de matière organique dans les sols soit généralement faible (en moyenne 1 à 5%), elle a une influence majeure sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (Vanloon et Duffy, 2000). Les molécules d'acide humiques et fulviques possèdent généralement une charge nette négative dans les sols, car la majorité de leurs groupes fonctionnels protonés se dissocient à des pH allant de 5 à 7 (Sposito, 1989).

D'un point de vue chimique, la matière organique est une matière complexe et hétérogène. Il y a, par exemple, des différences importantes entre la composition chimique de la matière organique fraîche (comme les résidus de végétaux) et l'humus du sol. Le type de matière organique a une influence sur son rôle dans le sol. Par exemple, les résidus de végétaux, le fumier et les boues d'épuration (qui sont souvent utilisés comme amendements en matière organique pour les terres agricoles) vont tous se comporter différemment suite à l'addition répétée de métaux dans le sol (McBride *et al.*, 1997).

La matière organique possède un rôle de protection et de stabilisation des diverses composantes du sol (e.g. les exo-enzymes). Cette capacité de stabilisation est

notamment le résultat d'un processus de formation d'agrégats. Les agrégats, en plus de leur fonction physique de protection, influent sur la structure de la communauté microbienne, contrôlent la diffusion de l'oxygène, régularisent le débit d'eau, régissent l'adsorption et la désorption des nutriments et réduisent le ruissellement et l'érosion du sol (voir (Six, *et al.*, 2004) pour une revue sur le sujet).

La formation des agrégats est le fruit de plusieurs processus, souvent favorisés par les différents organismes du sol. Les cinq facteurs principaux intervenant lors de la formation des agrégats sont : les variables environnementales, les agents de liaison inorganiques, les racines de plantes, la faune du sol et les microorganismes (voir (Six, *et al.*, 2004) pour une revue sur le sujet). La Figure 2.3 représente ces facteurs, qui ont une influence sur la formation et la stabilisation des agrégats dans les sols ainsi que sur leurs interactions.



**Figure 2.3 : Les multiples interactions et rétroactions entre les cinq principaux facteurs influençant la formation et la stabilisation des agrégats. Modifié de (Six, *et al.*, 2004). Les lignes pleines représentent les interactions et les lignes pleines les rétroactions.**

Comme dans tout ce qui a trait au sol, les interactions entre les différents facteurs sont multiples et mutuelles. La formation des agrégats produit des pores de différentes grosseurs, ce qui assure la protection de différents organismes du sol. Quatre types de pores qui sont disponibles pour la protection de microorganismes : les macropores, l'espace poreux entre les macro-agrégats, l'espace poreux entre les micro-agrégats et les pores à l'intérieur des micro-agrégats (Six, *et al.*, 2004). Notons que les bactéries sont protégées par les plus petits pores, à l'intérieur des micro-agrégats étant données leurs petites tailles. Ainsi la matière organique, et par extension, les micro-agrégats sont

d'une importance capitale pour la santé des sols, puisqu'ils assurent une stabilité des fonctions physiques, chimiques et biologiques des sols.

#### **2.1.4 Propriétés biologiques**

La biologie des sols est une composante indissociable de ceux-ci. Les sols comprennent deux grandes classes d'organismes : la faune et la flore. En l'absence de ces organismes, le sol ne parviendrait plus à remplir ses fonctions de dégradation des déchets organiques, de production des nutriments, de maintien d'un environnement sain. La faune et la flore des sols se subdivisent en catégories établies en fonction de la taille des espèces. La flore comprend la macroflore, regroupant des espèces de taille supérieure à 0,2 mm (racines, mousses), et la microflore, dont les espèces sont plus petites que 0,2 mm (mycètes, mycorhizes, bactéries, algues, etc.). La faune comprend trois catégories : la macrofaune (>2 mm), la mésofaune (0,2mm à 2mm) et la microfaune (<0,2 mm) (Brussaard, 1997). Certains de ces organismes sont hétérotrophes, d'autres sont autotrophes. La quantité de microorganismes contenue dans les sols est phénoménale. Par exemple, un sol à vocation agricole comprend en moyenne 108 cellules de bactéries cultivables par gramme de sol sec et les bactéries cultivables représentent seulement 10% des bactéries totales (Prosser, 1997). En tenant compte de la quantité de gènes communs d'une culture, de la définition d'une espèce de bactérie et en réalisant une extrapolation aux espèces rares, le nombre d'espèces de bactéries dans un gramme de sol oscille entre 20 000 et 40 000 (Brussaard, 1997). Par conséquent, l'auteur note que la majorité des organismes vivants dans les sols n'a

jamais été étudiée et que les connaissances actuelles sur la biodiversité des microorganismes sont infimes.

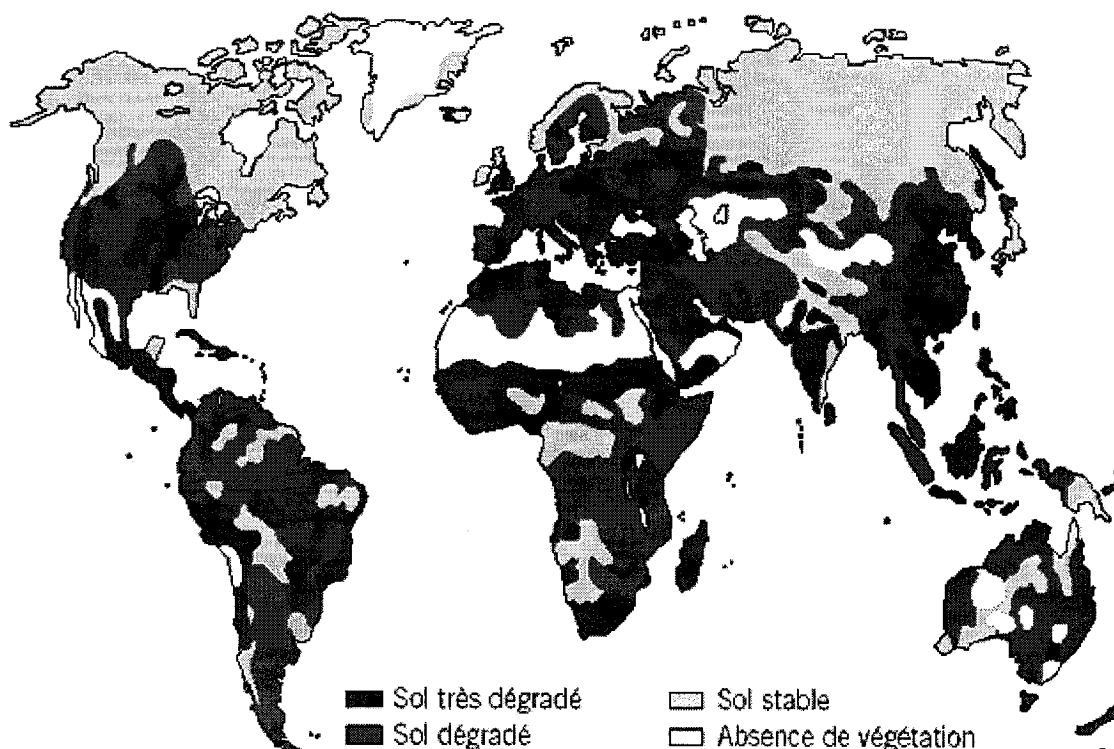
L'étroite interrelation qui existe entre les diverses espèces et les divers paramètres (physiques et chimiques) des sols est essentielle au fonctionnement du sol et, par extension, au maintien des écosystèmes. Par exemple, la présence de carbone organique favorise la croissance de la communauté microbienne, le pH influence la productivité des mécanismes microbiens et la présence de M.O. et d'argile favorise l'immobilisation des enzymes extracellulaires, tout en favorisant l'immobilisation des cellules elles-mêmes. À l'inverse, un changement dans la productivité des enzymes d'un sol peut engendrer des changements dans les propriétés chimiques et physiques du sol (Allison et Vitousek, 2005; Stotzky, 1997). Par exemple, plusieurs études ont démontré qu'un ralentissement de l'activité microbienne causé par la présence de métaux dans les sols entraîne une accumulation de matière organique (Baath, 1989).

Ainsi, le sol possède un équilibre fragile d'éléments physiques, chimiques et biologiques indissociables. Cet équilibre permet, par exemple, au sol de tamponner une bonne partie des conditions dommageables, fréquemment causées par l'activité humaine, qu'il peut subir. Toutefois, lorsqu'un certain seuil est atteint les sols se dégradent rapidement.

## **2.2 Dégradation des sols**

En 1993, l'activité humaine avait déjà occasionnée la dégradation de 23% de toutes les terres utilisables de la planète à un niveau affectant leur productivité (UNEP, 2002). La

dégradation des sols est une préoccupation mondiale. En effet, l'UNEP en 1993 a effectué un recensement du niveau de dégradation des terres à travers le monde. L'ampleur de la dégradation est illustrée à la Figure 2.4.



**Figure 2.4 : Étendue des zones de dégradation des sols sur la terre selon un recensement effectué en 1993 (UNEP, 2002).**

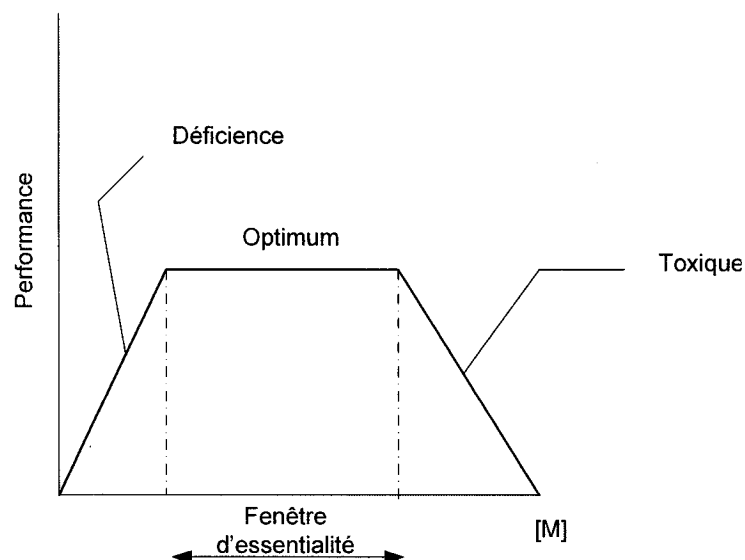
La dégradation des sols peut être causée par la présence de substances anthropogéniques (contaminants organiques ou inorganiques) ou par une mauvaise gestion du sol (e.g. monocultures intensives). Les contaminants métalliques, un sous ensemble des contaminants inorganiques, sont des polluants qui, contrairement à la majorité des contaminants organiques, ne peuvent subir aucune biodégradation par les microorganismes du sol.

### 2.2.1 Contaminants métalliques

Les métaux représentent un problème important pour la santé des sols. Ce problème est augmentée par leur persistance dans les sols. En effet, lorsqu'un contaminant métallique entre dans le sol, il peut y demeurer pendant de longue périodes : certains métaux possèdent des demi-vies de résidence dans les sols qui peuvent atteindre plusieurs milliers d'années (Brookes, 1995).

Il est clair que les métaux atteignant une certaine concentration dans les sols ont un effet toxique sur la faune et la flore des sols. Toutefois, certains métaux constituent des nutriments essentiels. En effet, ils jouent le rôle de catalyseur pour les réactions biochimiques ayant lieu dans les sols, agissent en tant que stabilisateur des structures protéiniques et des membranes des cellules bactériennes, et finalement permettent de maintenir l'équilibre osmotique (voir Bruins *et al.* (2000) pour une revue). Ainsi, pour les métaux dits essentiels, la performance des organismes évoluant dans les sols peut être affectée de deux façons : (i) une trop faible concentration de l'élément produit une carence en nutriments, (ii) une trop forte concentration de l'élément rend le milieu toxique. Entre ces deux concentrations seuils se trouve la fenêtre d'essentialité, un intervalle où la concentration de l'élément permet aux microorganismes des sols de fonctionner dans des conditions optimales. La relation entre la concentration des métaux dans les sols et la performance des microorganismes qui l'habitent est représentée à la figure 2.5.





**Figure 2.5 : Relation entre la performance des organismes exposés au métal et la concentration d'un métal essentiel, comme le cuivre, dans les sols. Modifié de Walker *et al.*, 2001.**

La présence de métaux dans les sols peut être d'origine naturelle ou anthropogénique. Selon la pédogenèse d'un sol et son matériel parental, la concentration naturelle d'un sol en métaux peut être déficiente pour les besoins des organismes ou excéder les concentrations de fond considérées comme étant *normales*.

#### 2.2.1.1 Effets des métaux sur les microorganismes et les processus du sol

Les microorganismes sont responsables de la majorité des processus impliqués dans les cycles biogéochimiques des sols. En groupe, ils ont la capacité de métaboliser toute substance d'origine naturelle ainsi que la vaste majorité des composés organiques anthropogéniques (Prosser, 1997). Par exemple, 90% de la décomposition des déchets organiques en carbone inorganique est effectuée par les bactéries et les mycètes

(Brussaard, 1997). Ainsi, la communauté microbienne est au centre des activités ayant trait à la capacité fonctionnelle du sol.

Indépendamment de leur provenance, les métaux présents dans les sols participent aux cycles géochimiques du sol et les affectent. De la même façon, les réactions biogéochimiques du sol sont influencées par la présence de métaux (Martinez *et al.*, 2003). Par exemple, les concentrations en cuivre total d'échantillons provenant d'un sol ayant été contaminé au cuivre il y a soixante-dix ans sont bien corrélées avec la concentration en matière organique des échantillons (Sauvé, 2006). Cette relation suggère que le cuivre a provoqué un effet d'inhibition sur le processus de décomposition de la matière organique et que, avec le temps, ceci s'est traduit par une accumulation de matière organique.

Les métaux peuvent affecter la capacité de fonctionner du sol de plusieurs façons (détaillées à la section 2.2.1.1). Les microorganismes ont développé divers mécanismes de résistance face aux effets toxiques des métaux. Ceux-ci sont bien documentés (voir Bruins, *et al.* (2000) pour une revue de la littérature). L'augmentation de la présence de microorganismes tolérants dans les sols pollués peut-être causée par : un changement génétique, une adaptation physiologique (sans altération du génome) ou par le remplacement des espèces sensibles par les espèces résistantes déjà en place (Baath, 1989). Toutefois, les métaux dans les sols peuvent affecter la diversité de la communauté microbienne au point que certaines souches peuvent devenir plus rares tandis que d'autres espèces semblent bien s'adapter (Wuertz et Mergeay, 1997). Par

exemple, Bécaert (2004) a montré, par l'analyse de profils DGGE, que la présence de cuivre modifie le patron des espèces dominantes du sol. Plusieurs auteurs s'entendent pour soutenir l'hypothèse selon laquelle la diversité de la structure microbienne assure une meilleure capacité à gérer des conditions dommageables, donc une meilleure stabilité du sol (voir par exemple Pimm (1984); Griffiths *et al.* (2000)). De cette façon, l'activité microbienne est aussi, en partie, responsable de la formation et du maintien de la structure du sol, de sa composition chimique et de la fertilité du sol (Prosser, 1997).

### **2.2.2 Le cuivre**

Le cuivre se retrouve fréquemment dans la structure des minéraux argileux, ainsi que dans le matériel parental. Toutefois, le cuivre se trouve sur la Terre à l'état de trace, soit à une concentration moyenne de 63 µg/g dans la croûte terrestre (Vanloon et Duffy, 2000). Bien que le cuivre soit un métal essentiel au développement des organismes, c'est un métal dont la toxicité est reconnue notamment pour ses propriétés fongicides. Il est également toxique pour les microorganismes en général. Il est considéré comme l'un des métaux affectant le plus les processus microbiens (Baath, 1989). De plus, il entraîne des impacts sur la santé des sols à long terme. Par exemple, Dumestre *et al.* (1999) ont montré que les processus de minéralisation et la structure microbienne de 20 échantillons de sols provenant de deux terres agricoles différentes étaient encore affectés par le cuivre plus de 50 ans après leur contamination.

Les sources anthropogéniques du cuivre sont principalement les dépôts atmosphériques des émissions d'industries (e.g. les fonderies), l'épandage de (e.g. vignoble) lisier de

porc ou de boues industrielles, l'application de sel de cuivre en milieu agricole, la lixiviation de la pluie sur certains types de bois traités ou le déversement « accidentel » (Brookes, 1995).

Actuellement, la législation sur les concentrations de métaux acceptables dans les sols est basée sur la concentration métallique totale. Par exemple, au Québec la législation prévue pour les niveaux de cuivre dans les sols est basé sur les critères suivants : A= 40 B=100, C=500 mg de cuivre/kg de sol sec. Le critère A fait référence à la teneur de fond, B à la limite maximale pour l'utilisation d'un terrain à des fins résidentielles, récréatives et institutionnelles, et le critère C est la limite maximale acceptable pour des terrains à vocation commerciale et industrielle (Environnement Québec, 1999).

Il est maintenant largement accepté que l'ion libre dans la solution de sol, comme en milieu aquatique, est la forme du métal provoquant la plus grande réponse écotoxicologique pour les microorganismes dans les sols (voir McGrath, 2002 pour une revue de la littérature). En effet, il a été démontré que la quantité totale du métal dans un sol ne reflète pas sa biodisponibilité pour les plantes et les organismes du sol (McGrath *et al.*, 1999). Par exemple, dans une étude sur un sol dont la contamination au cuivre datait de plusieurs décennies, la concentration totale de cuivre était insuffisante pour expliquer la variation de la période de latence de la respiration microbienne : l'échantillon ayant la plus forte concentration n'était pas celui le plus affecté par le contaminant (Dumestre *et al.*, 1999). Pour ces raisons, il est important de considérer la spéciation des contaminants métalliques dans un sol.

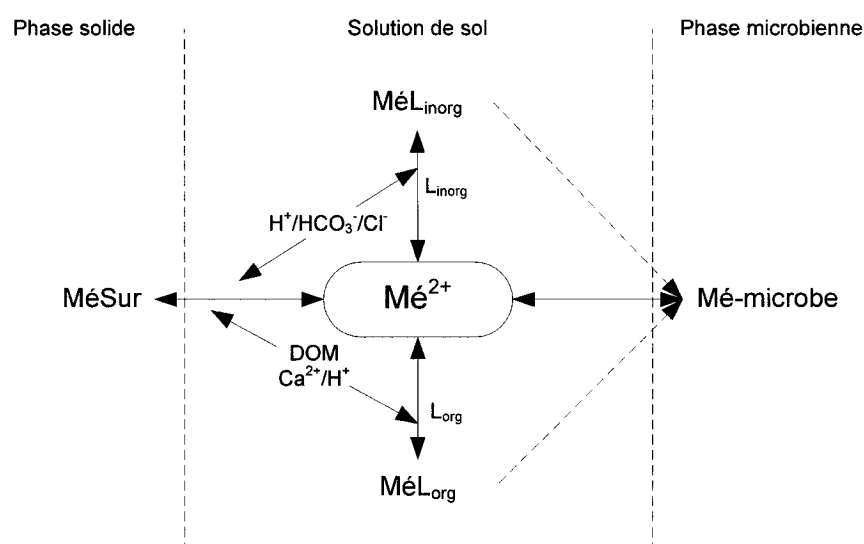
### 2.2.2.1 Spéciation du cuivre

Le cuivre peut adopter plusieurs formes, c'est ce que l'on appelle fractionnement, partition ou spéciation. La spéciation fait principalement référence aux formes chimiques du cuivre dans la solution du sol, notamment : l'ion libre, les ions inorganiques appariés et les complexes organométalliques avec les substances organiques dissoutes (Sauvé, 2002).

Les diverses formes de cuivre sont retenues dans les sols par interactions électrostatiques sur les minéraux et sur les sites d'échange de la matière organique suivant des phénomènes d'adsorption/désorption, d'absorption et d'isomorphisme. Le mécanisme le plus important est l'adsorption/désorption. Le phénomène d'adsorption dépend d'une multitude de variables comme le pH, le contenu en argile et en matière organique, les oxydes de fer, de manganèse, d'aluminium et la capacité d'échange cationique (CEC). Le cuivre possède une affinité particulièrement élevée pour la matière organique du sol et, par conséquent, pour la matière organique dissoute dans la solution du sol.

Par exemple, Mesquita *et al.* (2005) ont calculé des ratios de distribution ( $D$ ), soit une valeur reliée au coefficient de distribution  $K_d$  ( $D=K_d/10$ ), pour des sols contaminés au Cu et au Zn. Les sols testés avaient un pH de 4 ou de 7 et certains sols étaient amendés avec des boues pour augmenter la DOC. Les auteurs ont conclu que les valeurs de  $D$  ont montré que la DOC avait un effet sur l'adsorption du cuivre.

La disponibilité des métaux pour les organismes du sol se fait principalement à travers la solution du sol. D'un point de vue écotoxicologique c'est l'équilibre entre les phases liquide et solide du sol qui contrôle la mobilité et la toxicité des contaminants métalliques du sol comme le cuivre (Krishnamurti *et al.*, 2002). La forme du cuivre dans les sols au moment de la contamination initiale est peu importante : ce qui importe c'est la forme que prend le cuivre une fois dans l'environnement, les microorganismes étant davantage sensibles à la distribution des fractions inertes et réactives du cuivre qu'à la concentration totale de cuivre (Sauvé, 2003). La figure 2.6 présente les facteurs environnementaux déterminant l'exposition des microorganismes des sols aux métaux traces, comme le cuivre.



**Figure 2.6 : Facteurs environnementaux déterminant l'exposition des métaux traces aux microorganismes des sols (Allen, 2002). Les métaux liés au sol ( $MéSur$ ), aux ligands organiques ( $MéL_{org}$ ), aux ligands inorganiques ( $MéL_{inorg}$ ) et aux microbes ( $Mé-microbe$ ) sont représentés dans les différentes phases du sol.**

La littérature illustre bien l'importance de mesurer la concentration du cuivre soluble et l'activité de l'ion libre en plus de la concentration totale du métal. Il a été proposé d'exprimer les concentrations de contaminants métalliques directement à l'aide d'une « fraction biodisponible » qui aurait une relation statistique plus explicite avec la toxicité (Lock et Janssen, 2003).

L'activité du cuivre libre (généralement exprimé sous la forme  $pCu^{2+}$ ) correspond au log négatif de la partie active de la concentration de l'ion libre du cuivre en solution (équation 2.1).

$$pCu^{2+} = -\log_{10} (\alpha[Cu^{2+}]) \quad \text{Équation 2.1}$$

En choisissant d'utiliser l'activité de l'ion libre pour décrire la fraction du cuivre qui intervient effectivement dans les mécanismes de toxicité, on assume que la biodisponibilité et la toxicité sont contrôlées par l'activité de l'ion libre en solution et non par la concentration totale du métal dissous (Sauvé, *et al.*, 2000). Cette approche est acceptée en écotoxicité aquatique et de plus en plus utilisée dans le domaine des sols contaminés (voir McGrath, 2002 pour une revue).

La mesure de l'activité de l'ion libre a été proposée comme une méthode « unificatrice » car celle-ci est influencée à la fois par toutes les propriétés déterminant la biodisponibilité des métaux, soit le pH, la M.O. et le COD (McGrath, 2002).

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'activité de l'ion libre des métaux dans la solution de sol. Par exemple, il y a les méthodes électrochimiques comme l'électrode spécifique à l'ion cuivre (ISE) et la voltampérométrie différentielle impulsionnelle et les

méthodes non-électrochimique comme la chelation compétitive, les résines échangeuses d'ions et les membranes dialytiques Donnan (Sauvé, 2002). Il n'y a pas encore de consensus dans la littérature sur la meilleure méthode à adopter. Toutefois, Sauvé (2002) conclut que la meilleure méthode pour évaluer l'activité du cuivre libre est l'ISE.

### **2.3 Indice pour détecter la dégradation des sols**

La définition des concepts de qualité et de santé des sols (voir 2.1) est liée au besoin de développer un outil permettant d'évaluer cette qualité. Dans une ère où l'exploitation des sols hypothèque la survie de plusieurs espèces, dont les hommes, il est plus qu'urgent de concrétiser le développement d'un tel outil d'évaluation. Pour qu'un indicateur de la qualité et de la santé du sol soit utile, il doit répondre à certains critères : une bonne sensibilité aux perturbations climatiques et à la contamination, une relation avec les fonctions du sol, une bonne reproductibilité et une faible variation temporelle et spatiale. Un tel indicateur doit de plus être facile à mettre en œuvre : il faut utiliser une technique d'échantillonnage ainsi qu'une méthode analytique simple (Hinojosa *et al.*, 2004). L'indicateur doit également être accessible aux spécialistes de l'agriculture, aux producteurs, aux écologistes et aux inspecteurs qui doivent faire respecter la législation en vigueur (Doran et Zeiss, 2000). Karlen *et al.* (1997) proposent d'orienter les efforts sur une fonction spécifique des sols inhérente à un écosystème défini. De cette façon, le concept de qualité des sols peut être utilisé comme un pont entre les diverses sphères d'intérêt.



Ainsi, le développement de méthodes pour évaluer la qualité et la santé des sols a une importance capitale. La difficulté de développement d'un tel indice de la qualité des sols est accrue par le fait que plusieurs changements dans les sols ne sont observables qu'après une longue période de temps. Cette capacité à tamponner les effets d'un contaminant ou d'une gestion causant des dommages au sol résulte de la nature complexe et dynamique des sols. En tenant compte de la variabilité induite par la multiplicité des propriétés contrôlant les processus liés aux cycles biogéochimiques ainsi que de la variabilité temporelle et spatiale de ces propriétés et de leurs interactions, il est difficile de distinguer les changements naturels des changements causés par des sources extérieures et dommageables avant l'atteinte d'un certain seuil (Nortcliff, 2002). Ainsi, la dégradation de la qualité d'un sol ne sera évidente que lorsque que des impacts cumulatifs auront eu lieu (Nortcliff, 2002). Pour ces raisons, il est important de développer des outils qui seront à la fois sensibles aux faibles variations de la fonction mesurée et capables de distinguer une variation naturelle d'une variation liée à la dégradation de la santé du sol.

### **2.3.1 Indicateurs basés sur les propriétés physiques et chimiques**

Les indicateurs de santé des sols utilisant les propriétés physiques sont surtout basés sur les caractéristiques suivantes : la compaction, la porosité, la classe texturale, la force et la stabilité des agrégats, l'encroûtement du sol, la densité apparente et la profondeur de l'horizon de surface (Nortcliff, 2002).

Les indicateurs basés sur les propriétés chimiques du sol incluent habituellement la quantité de matière organique, le pH, le contenu de O<sub>2</sub>, la salinité, la capacité d'échange cationique, la concentration des nutriments essentiels à la croissance des plantes, la concentration des éléments potentiellement toxiques et la capacité tampon du sol face aux changements (Nortcliff, 2002). La classification des types d'indicateurs chimiques et physiques des sols ainsi que leur importance sont brièvement revues par Bécaert et Deschênes (2006).

### **2.3.2 Indicateurs basés sur les propriétés biologiques**

Les organismes du sol et les paramètres biotiques répondent à la majorité des critères essentiels quant à leur utilisation comme indicateurs de la qualité du sol (Doran et Zeiss, 2000). Ainsi, plusieurs tests écotoxicologiques ont été développés pour estimer l'impact toxique des contaminants dans les sols.

Plusieurs études se sont intéressées aux microorganismes, et principalement à leur rôle clé dans la capacité fonctionnelle du sol. Toutefois, probablement à cause de leur taille, de leur nombre et de leur diversité, ainsi que de la complexité et du nombre de fonctions possibles à évaluer, l'impact d'une contamination sur les microorganismes n'est pas utilisée dans les évaluations de risques ou dans d'autres outils d'évaluation de l'état du sol (McGrath, 2002). Pourtant, d'après McGrath (1994), plusieurs études semblent montrer que les microorganismes sont plus sensibles à une contamination métallique que d'autres organismes comme des plantes ou des organismes de la macrofaune. Le Tableau 2.1 regroupe la majorité des tests sur les microorganismes et les processus

microbiens qui ont été développés et leur attribue un indice de fiabilité, de facilité d'utilisation, de pertinence et de sensibilité (L=faible, M=moyenne et H=forte).

**Tableau 2.1 : Paramètres microbiens utilisés pour tester l'écotoxicité du sol (McGrath *et al.*, 2002).**

Mesures	Fiabilité	Facilité	Pertinence	Sensibilité
<i>Processus liés au carbone</i>				
Décomposition du C <sup>14</sup> de résidus de plantes	H	L	H	L
Respiration basale	H	H	H	L
Source unique de C (SIR)	H	H	H	M
Utilisation <i>in situ</i> de C (SIR avec plusieurs sources de C)	H	L	H	M
Temps de latence respiration	H	H	H	H
Respiration spécifique à la biomasse ( $qCO_2$ )	H	H	H	M
Décomposition de litière	H	H	H	L
Utilisation de substrat Biolog®	L	L	L	L
Extraction par fumigation (biomasse microbienne)	M	M	H	M

**Tableau 2.1 : Paramètres microbiens utilisés pour tester l'écotoxicité du sol (McGrath *et al.*, 2002) (suite).**

Mesures	Fiabilité	Facilité	Pertinence	Sensibilité
<i>Processus régis par l'azote, le phosphore ou le soufre</i>				
Nitrification	H	H	H	L
Dénitrification	L	L	H	M
Minéralisation biologique de l'azote	H	H	H	L
Fixation d'azote (autotrophe)	L	L	H	H
Fixation d'azote (hétérotrophe)	L	L	L	H
Transformation de S, de P	L	L	M	L

**Tableau 2.1 : Paramètres microbiens utilisés pour tester l'écotoxicité du sol (McGrath *et al.*, 2002) (suite).**

Mesures	Fiabilité	Facilité	Pertinence	Sensibilité
<i>Analyse de diversité</i>				
Mesures moléculaires				
(plusieurs techniques possibles)	L	L	H	H
Ester méthylique d'acide gras (FAME)	L	L	H	H
Analyse des esters				
phospholipides liés aux d'acide gras (PFLA)	L	L	H	H
Sondes fluorescentes	M	L	M	H

**Tableau 2.1 : Paramètres microbiens utilisés pour tester l'écotoxicité du sol (McGrath *et al.*, 2002) (suite).**

Mesures	Fiabilité	Facilité	Pertinence	Sensibilité
<i>Mesures conventionnelles</i>				
Organismes cultivables	M	M	M	L
Nombre le plus probable de cellules	L	L	H	L
Tolérance (incorporation de thymidine/leucine)	M	L	M	L
Dégradation xénobiotique	M	L	M	??
Processus régis par des enzymes	L	H	L	M
<i>Essais utilisant des organismes ajoutés et des extraits aqueux</i>				
Système basé sur lux	H	H	L	H
Microtox®	H	H	L	H
Protozoaire	M	M	H	M

Il existe, en effet, beaucoup de publications sur le comportement des microorganismes ou sur les processus microbiens des sols subissant un stress dû à la présence de métaux

traces (e.g. Baath et Diaz-Ravina, 1998; Perez-de-Mora *et al.*, 2005; Dumestre, *et al.*, 1999; Effron *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 1997; Struczynski *et al.*, 2003). L'impact sur les microorganismes est généralement évalué à l'aide de comptes microbiens, de l'activité enzymatique, de la respiration ou de la biomasse du carbone et de l'azote. Les différentes méthodes pour évaluer ces impacts sont revues en détail par Brookes (1995). Wuertz et Mergeay (1997), qui soulignent que, trop souvent, les paramètres importants (e.i. propriétés physico-chimiques) des sols ne sont pas rapportés dans ce genre d'études. Par conséquent, l'influence des facteurs abiotiques sur les métaux traces en relation avec les microorganismes ne peut pas être mise en lumière.

Les mesures basées sur les processus enzymatiques sont particulièrement intéressantes du fait de leur facilité de mise en oeuvre. Toutefois, d'après le Tableau 2.1 elles sont peu fiables et peu pertinentes. La piètre fiabilité des tests basés sur les enzymes peut être expliquée par la variabilité de l'activité enzymatique et par la forte influence du pH sur celle-ci (voir section 2.3.2.1 et section 2.3.2.2). Pourtant, l'activité enzymatique semble répondre plus rapidement aux changements biologiques subtils de l'état de santé du sol que d'autres variables du sol (Bandick et Dick, 1999). De plus, certains auteurs considèrent que l'évaluation de l'activité enzymatique apporte des informations pertinentes sur la santé du sol. Par exemple, Aon *et al.* (2001) soulignent que l'activité enzymatique des sols semble être une candidate idéale comme indicateur de la santé des sols, car elle intègre l'information sur l'état des microorganismes et les conditions physico-chimiques du sol.



### 2.3.3 Activité enzymatique

Le potentiel de l'activité enzymatique satisfait aux critères de sélection d'un bon indicateur de la santé des sols car il mesure, de façon indirecte, le fonctionnement des populations microbiennes en place. En effet, la production microbiologique des enzymes extracellulaires est liée à l'activité microbienne ainsi qu'aux propriétés physico-chimiques du sol. Ainsi, les enzymes du sol sont l'un des constituants les plus sensibles de l'écosystème terrestre et, potentiellement, un excellent indicateur de l'état des fonctions microbiennes du sol et de sa diversité (Sowerby *et al.*, 2005). De plus, les mécanismes de protection des enzymes du sol sont probablement les mêmes mécanismes que ceux limitant l'absorption des métaux par les plantes ou les organismes du sol (Speir et Ross, 2002). Ainsi, l'inhibition de l'activité enzymatique dans un sol contaminé par des métaux devrait refléter la biodisponibilité des métaux. Speir and Ross (2002) soulignent que l'utilisation de l'activité enzymatique des sols afin d'évaluer la dégradation des sols par la présence de métaux traces est pratiquement un indicateur ou un biosenseur d'effet plus général et ne requiert aucune connaissance spécifique sur la fonction et l'origine de l'enzyme du sol. L'activité enzymatique possède toutes ces qualités principalement grâce au rôle central et crucial qu'elle joue dans les processus de maintien de l'écosystème (Dick, 1997).

Bien que le potentiel de l'activité enzymatique des sols en tant qu'indicateur de la dégradation des sols soit reconnu, plusieurs problèmes ont limité son utilisation. Dans les sections suivantes deux problèmes importants liés à l'évaluation de l'activité

enzymatique seront abordés : la variabilité de l'activité enzymatique et l'influence du pH. Par la suite, deux enzymes d'intérêt seront présentées : la  $\beta$ -glucosidase et la protéase.

#### *2.3.3.1 La variabilité*

L'activité enzymatique est sujette à d'importantes variations spatiales et temporelles dans les sols. Ainsi, il est difficile de comparer les résultats d'activité enzymatique entre différentes études. Gil-Sotres (2005) impute ce problème au manque de standardisation des méthodes de prétraitement des échantillons, des conditions d'entreposage et des méthodes analytiques. Ce dernier point est aussi soulevé par McGrath (2002) comme la cause des difficultés de comparaison des résultats de différentes études. Toutefois, même si une méthodologie standard était adoptée et suivie au pied de la lettre, la comparaison entre différentes études resterait difficile à cause des inévitables variations biologiques. Dans la nature, les variations naturelles sont fréquentes. Elles peuvent être générées par des influences comme celles des conditions environnementales, des naissances et des morts au sein de la communauté microbienne, des interactions entre les individus du sol, etc. (Stewart-Oaten et Murdoch, 1986). Ces variations, également liées à l'hétérogénéité spatiale et temporelle des sols, occasionnent de grandes variations naturelles et un manque de contrôle sur l'activité des enzymes.

#### *2.3.3.2 L'influence du pH*

Même si une standardisation était établie au niveau de la méthodologie pour la mesure de l'activité enzymatique, la comparaison entre les résultats des différentes études serait

compliquée du fait de l'influence importante du pH sur la mesure de l'activité enzymatique des sols contaminés par des métaux. La mesure de l'activité enzymatique d'un sol est affectée par le pH pour trois raisons : (1) le pH influence la cinétique de la réaction enzyme-substrat, (2) le pH influence la spéciation du métal et (3) le pH contrôle les sites d'adsorption de la matière organique.

L'influence du pH sur la cinétique de la réaction enzyme-substrat est un problème qui est souvent contourné en utilisant un tampon ayant une valeur de pH optimale pour la réaction enzyme-substrat. Cette pratique permet, entre autres, d'obtenir des réponses enzymatiques plus fortes, ce qui facilite la détection d'une inhibition. Par contre, il existe des problèmes quant à la détermination du pH optimal et au choix du tampon. En effet, Geiger (1999) rapporte, lors d'une étude contrôlée sur la  $\beta$ -glucosidase, que la présence de cuivre provoque un changement du pH optimum de la réaction enzyme substrat. Il remarque aussi que le type de tampon utilisé (i.e. sa composition chimique) peut affecter l'activité de l'enzyme. Dick (1997), pour sa part, explique que les enzymes des sols proviennent de diverses sources et possèdent différentes cinétiques. Par conséquent, le pH optimal pour une enzyme varie dans le temps et dans l'espace : il est directement relié aux types et à la proportion des sources de l'enzyme pour un sol spécifique. Les enzymes dans les sols peuvent être sécrétées, entre autres, par les bactéries, les champignons et les racines des plantes. Elles peuvent être intracellulaires (associées avec la cellule vivante), extracellulaires ou abiotiques (Dick, 1997).

L'influence du pH sur la spéciation des métaux, notamment celle du cuivre, est due au fait qu'un changement de pH occasionne un changement de l'équilibre chimique et donc de la proportion des espèces de cuivre présentes dans le sol (voir section 2.2.2.1). Les différentes espèces du cuivre peuvent être solubles, immobilisées, inertes ou réactives (Sauvé, 2002). La spéciation du cuivre affecte l'activité enzymatique du sol par (i) un effet toxique sur les microorganismes qui produisent l'enzyme, (ii) l'interaction chimique de certaines formes du cuivre avec l'enzyme. Cette dernière interaction peut avoir lieu par la combinaison d'ions libres avec les sites actifs de l'enzyme, par la complexation avec le substrat et par réaction avec le complexe enzyme-substrat (Dick, 1997).

L'effet du pH sur la protonation de la matière organique, donc sur sa CEC, est dû au fait que les protons entrent en compétition avec le cuivre pour les sites d'adsorption qu'offre la matière organique, aussi bien dans la phase liquide que dans la phase solide du sol (section 2.1.3.2). De plus, la solubilisation des matières humiques est aussi dépendante du pH. Les sites d'adsorption sur la matière organique solide ou dissoute (COD) jouent des rôles importants dans la protection et la stabilisation des enzymes (Nannipieri *et al.*, 2002; Tabatabai, 1994). De plus, l'augmentation de la concentration en COD peut entraîner une augmentation de la mobilité du cuivre et de sa biodisponibilité (Martinez, *et al.*, 2003), ce qui signifie que le cuivre, plus mobile et biodisponible, risque de réduire encore davantage l'activité enzymatique.

Le pH est donc d'une importance majeure dans les sols, car il contrôle plusieurs autres paramètres du sol et les équilibres établis entre ceux-ci.

#### 2.3.3.3 *β-glucosidase*

Les glucosidases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse de différents glucosides, produisant ainsi du sucre (de la Horra *et al.*, 2003). La  $\beta$ -Glucosidase est considérée comme une enzyme clé dans le cycle biogéochimique du carbone. Plus spécifiquement, la  $\beta$ -Glucosidase catalyse l'hydrolyse de la  $\beta$ -Glucopyranoside, ainsi elle est impliquée dans l'hydrolyse de la cellulose. Son importance est liée au fait qu'elle dégrade des hydrates de carbone et assure l'approvisionnement en nutriments nécessaires pour la croissance des organismes hétérotrophes des sols (de la Horra, *et al.*, 2003).

L'évaluation de l'activité de la  $\beta$ -Glucosidase a été fréquemment utilisée dans les sols (voir e.g. Aon *et al.* (2001); de la Paz Jimenez *et al.* (2002); Hinojosa, *et al.* (2004); Sowerby, *et al.* (2005)) et a été reconnue comme un bon indicateur de la santé des sols (Bandick et Dick, 1999; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Knight, 2004).

#### 2.3.3.4 *Protéase*

La protéase est une enzyme impliquée dans le cycle de l'azote, qui comprend quatre étapes de transformation importantes : la fixation de l'azote, l'ammonification, la nitrification et la dénitrification. Le cycle de l'azote joue un rôle important dans les sols, ses diverses formes servant de nutriments essentiels pour les plantes et les animaux. L'azote est souvent un nutriment limitant dans les sols. Les processus impliqués dans les phases de transformation du cycle de l'azote sont catalysés par des enzymes comme

la protéase. Cette dernière est une enzyme cinétiquement limitante du processus de minéralisation de l'azote (de la Horra, *et al.*, 2003). Elle est pourtant peu utilisée comme indicateur de la santé des sols bien que, lors d'une récente étude, la protéase a montré un bon potentiel comme indicateur pour les sols contaminés aux métaux (Effron, *et al.*, 2004).

#### 2.3.3.5 Conclusion sur l'activité enzymatique

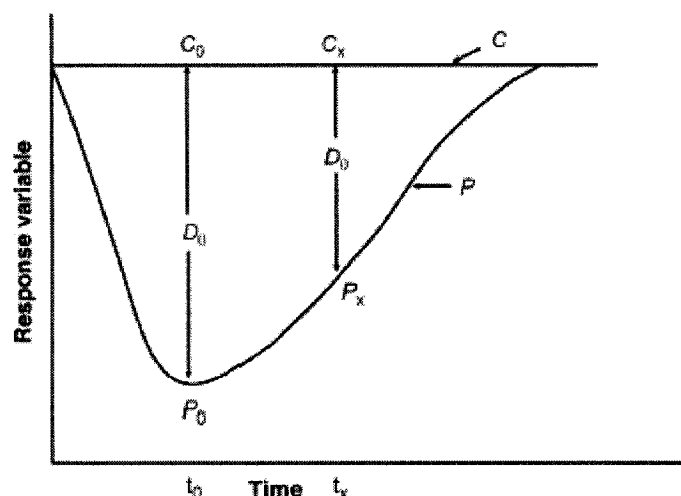
En conclusion de la section 2.3.2, il est à noter que l'activité enzymatique peut, certes, être un indicateur potentiel de la santé des sols, mais les problèmes liés à son utilisation (e.g. la variabilité et l'influence du pH) ont amené plusieurs auteurs à s'interroger sur ses limites et à remettre en question son utilisation (voir (Bécaert et Deschênes, 2006) pour une revue). Par contre, il a été suggéré de contourner ces difficultés en utilisant les enzymes du sol comme indicateur interne ou relatif indépendant du type de sol.

#### 2.3.4 Indicateur de la stabilité fonctionnelle des sols

La majorité des études écotoxicologiques en laboratoire mesurent l'impact d'un seul facteur de stress sur un organisme, comme un contaminant chimique à différentes concentrations, et ce dans des conditions environnementales optimales. Pourtant, dans un environnement naturel, les organismes sont amenés à être confrontés à des variations simultanées des caractéristiques physiques et chimiques, ce qui peut entraîner des réponses inattendues ou imprévisibles (Sørensen *et al.*, 2002). Par exemple, suite à une étude évaluant l'impact sur les vers de terre des stress combinés du cuivre et d'une sécheresse dans un sol, Friis *et al.* (2004) concluent que la sécheresse, en combinaison

avec le cuivre, crée un effet de type synergique, augmentant la mortalité à des niveaux de sécheresse et de cuivre considérés comme sub-létaux lorsque appliqués individuellement.

Le sol, considéré comme un écosystème vivant, doit démontrer une certaine stabilité pour être en mesure de survivre et de participer au cycle global de la vie (Bécaert, 2004). Par conséquent, un sol en santé devrait récupérer totalement dans le temps après avoir subi une perturbation, qu'elle soit d'origine physique (sécheresse, gel/dégel, feu) ou anthropogénique (pollution organique/inorganique, labourage, monoculture). Le concept de stabilité du sol fait référence à la capacité du sol à demeurer en équilibre ou à rétablir l'équilibre initial de ses fonctions suite à une perturbation. Pimm (1984) définit la stabilité d'un sol selon deux aspects : la résistance et la résilience. Il définit la résistance comme étant le degré de changement d'une variable réponse suite à une perturbation, et la résilience comme étant la vitesse ou le taux de récupération vers un état d'équilibre de la fonction du sol étudiée. Une autre définition de la résilience, moins utilisée, a été élaborée. La résilience peut être définie comme l'ampleur de la perturbation qui peut être absorbée avant que le système expérimente un changement. La première définition est souvent appelé « résilience de l'équilibre » et la seconde « résilience de l'écosystème » (Seybold *et al.*, 1999). La figure 2.7 représente la résistance et la « résilience de l'équilibre ».



**Figure 2.7 : Exemple de la résistance et la résilience d'un variable réponse suite à une perturbation. Figure tiré de (Orwin et Wardle, 2004).**

Orwin et Wardle (2004) expliquent que la variable réponse peut être n'importe quelle variable biotique ou abiotique du sol. La ligne supérieure représente le contrôle (non perturbé), et la courbe inférieure le sol ayant subi une perturbation. Pour la résistance (i.e. temps 0 ou  $t_0$ ), la valeur du sol contrôle est  $C_0$ , la valeur pour le sol perturbé est  $P_0$ , et  $C_0 - P_0 = D_0$ . Un exemple de la valeur utilisée pour montrer la résilience ou la récupération est donné à  $t_x$ , avec la valeur du sol contrôle à  $C_x$ , la valeur du sol perturbé à  $P_x$  et la différence entre les deux ( $D_x$ ). Le temps  $x$  ( $t_x$ ) peut être n'importe quand après  $t_0$ .

La perturbation subie par un sol peut être d'ordre chimique (e.g. contamination par les métaux) ou physique (changement climatique), de nature naturelle ou anthropogénique. Dans la réalité, ce genre de perturbation est courant. Pour cette raison, il est important



que les microorganismes du sol, régissant la majorité des fonctions biologiques, puissent offrir une certaine stabilité afin de prévenir la dégradation de l'écosystème.

Plusieurs auteurs ont tenté de développer des indices permettant de mesurer ces paramètres. Le tableau 2.3 rapporte des exemples d'indices de résistance et de récupération proposés par certains auteurs (les variables des indices sont définies de la même façon qu'à la figure 2.7).

**Tableau 2.2 : Indices de résistance et de résilience (modifié de Orwin et Wardle, 2004)**

Sources	Indice de résistance	Indice de résilience
(Griffiths <i>et al.</i> , 2001, 2000)	$\left(C_0 - \frac{P_0}{C_0}\right) \times 100$	$\left(C_x - \frac{P_x}{C_x}\right) \times 100$
(Kaufman, 1982)	$\frac{P_0}{C_0}$	$\frac{P_x}{C_0}$
(Orwin et Wardle, 2004)	$1 - \frac{2 \times  D_0 }{(C_0 +  D_0 )}$	$\frac{2 \times  D_0 }{(D_0 +  D_x )} - 1$

Les indices de résistance et de résilience proposés par Griffiths *et al.* (2001 et 2000) ne permettent pas la comparaison entre les sols, car la valeur de la résistance est fonction de  $C_0$  tandis que la valeur de la résilience est fonction de  $C_x$ . L'indice proposé par Kaufman (1982) donne la fraction de la mesure de la fonction à un temps donné par rapport à la valeur initiale de la fonction. Finalement, Orwin *et al.* (2004) ont développé

des indices de manière à ce que leur valeur ne soit jamais égale à zéro, toutefois ces indices n'apportent pas d'information écologiquement intéressante. Le point commun des indices proposés au Tableau 3 est qu'aucun des indices n'inclut le taux de récupération. Les indices sont calculés à un instant précis dans le temps. Ainsi, ceux-ci n'intègrent pas la dynamique de récupération de la fonction, soit une caractéristique clé des écosystèmes. Un suivi de la fonction dans le temps est donc à privilégier.

Au laboratoire, une perturbation est appliquée sur un sol et une fonction peut être mesurée après une période donnée ou en suivant la fonction dans le temps. Les études sur le sujet diffèrent par le type de perturbation appliqué et le choix de la fonction étudiée. L'effet de la combinaison de stress d'ordres différents peut aussi être évaluée. Par exemple, Griffiths *et al.* (2000) ont étudié l'effet de la perturbation thermique (court chauffage à 40°C) d'un sol contaminé au cuivre sur la minéralisation du carbone suite à l'ajout de glucose. Récemment, un indice de stabilité relative des sols (Relative Soil Stability Index- RSSI), a été proposé afin d'évaluer l'impact du 2,4-D sur la stabilité du sol en appliquant une perturbation thermique (Bécaert *et al.*, 2006)). Les fonctions étudiées étaient l'activité de sept différentes enzymes des sols et ont été suivies pendant 15 jours. Les résultats montrent une perte de la stabilité fonctionnelle de l'uréase, de la  $\beta$ -glucosidase et de la sulfatase dans le sol contaminé au 2,4-D. Le RSSI est le ratio de l'activité enzymatique d'un sol ayant subi une perturbation ( $AE_{\text{perturbé}}$ ), comme une sécheresse, intégrée sur une période de temps déterminée, par rapport à l'activité enzymatique du même sol n'ayant pas subi de perturbation ( $AE_{\text{non-perturbé}}$ ) et intégrée sur la même période de temps (équation 2.2).

$$RSSI = \frac{\int_{jour1}^n AE_{perturbé}(t) dt}{\int_{jour1}^n AE_{non-perturbé}(t) dt} \times 100\% \quad \text{Équation 2.2}$$

La valeur de l'indice obtenu représente le pourcentage de travail que le sol arrive à accomplir pendant une période de temps déterminée suite à une perturbation par rapport au travail qu'il aurait accompli s'il n'avait pas subi de perturbation.

Une telle approche est intéressante pour l'avancement des connaissances sur la santé des sols, mais pourrait aussi trouver une application dans le contexte de l'analyse du cycle de vie. Plus particulièrement dans la catégorie d'impact « utilisation du territoire ». En effet, il n'y a pas de consensus actuellement sur la façon d'évaluer les impacts de l'utilisation du territoire (voir Lindeijer, 2000 pour une revue de la littérature sur le sujet). Afin, de prendre en compte les différents types de dommages pouvant être causés aux sols, deux types d'indicateurs ont été proposés : l'un basé sur la biodiversité et l'autre sur les fonctions de support à la vie. C'est à titre d'indicateur basé sur les fonctions de support à la vie que le RSSI pourrait être utilisé : jusqu'à présent, cet indicateur a consisté généralement en la mesure de la production primaire nette (PPN), soit la production de biomasse pour un sol par année (Lindeijer, 2000). Toutefois, cette approche ne tient pas compte de l'activité intrinsèque du sol. Par exemple, un sol de la toundra peut produire très peu de biomasse et être en parfaite santé, tandis qu'un sol agricole des prairies peut présenter une PPN importante et être significativement dégradé par les pratiques de culture. Ainsi, une approche comme le RSSI pourrait

permettre d'évaluer l'impact de divers stress subis par le sol en fonction de l'activité enzymatique intrinsèque de celui-ci, puisque l'activité du sol est standardisée par elle-même.

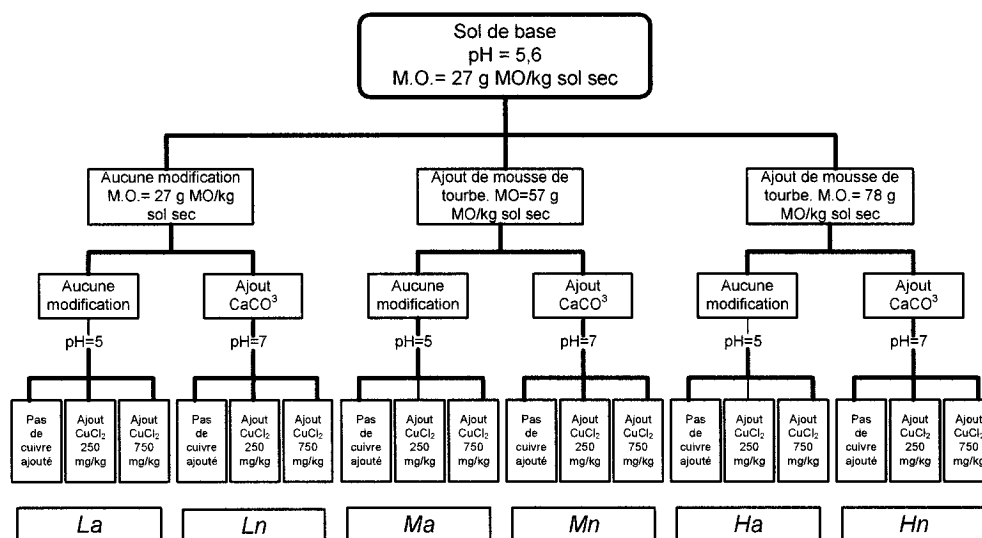
### **Chapitre 3      Approche méthodologique**

L'évaluation de la santé des sols est particulièrement difficile lors d'études de terrain, en raison de la complexité des relations édaphiques. Pour cette raison, il a été choisi d'utiliser un sol naturel de base dont seules quelques caractéristiques ont été modifiées. Les propriétés chimiques qui ont été sélectionnées pour être modifiées sont : le contenu en matière organique du sol, le pH et la concentration du contaminant, soit le cuivre. De cette façon, il est possible de limiter la variabilité et de mieux définir les relations entre la réponse (i.e. l'activité enzymatique) et les variables contrôlées (i.e. M.O., pH, Cu). Les raisons justifiant le choix de la matière organique et du pH comme variables contrôlées sont élaborées au chapitre 2. La méthodologie adoptée dans ce projet de recherche est une étude expérimentale contrôlée.

Un design expérimental factoriel complet à trois facteurs fixes (3X2X3) de 18 échantillons a été conceptualisé pour cette étude. Les traitements des sols ont été faits à partir de 30 kg de sol naturel à vocation agricole qui ont été échantillonnés à la ferme expérimentale du Campus Macdonald de l'université McGill, située à Ste-Anne-de-Bellevue (Montréal, QC, Canada). Les caractéristiques du sol (pH, CRC, COT, granulométrie) ont été mesurées (Annexe A1-1). Le sol échantillonné est un sable contenant 88 % (p/p) de sable, 10% (p/p) de limon et 2 % (p/p) d'argile selon la classification de l'USDA (USDA, 2005). Des traitements successifs ont été réalisés sur le sol de base (M.O.= 27 g MO/kg sol sec, pH= 5,6) afin de modifier chacune des variables contrôlées :

- Dans un premier temps, un amendement en mousse de tourbes a été ajouté pour augmenter le contenu en matière organique du sol (annexe A1-2). Le premier tier du sol n'a subi aucune modification, les deux autres tiers ont vu leur teneur en MO augmenter jusqu'à atteindre respectivement 57 g MO/kg sol sec et 78 g MO/kg sol sec;
- Dans un second temps, un ajout de 1% (p/p) de  $\text{CaCO}_{3(s)}$  a été effectué sur la moitié des échantillons de sol pour chaque teneur en MO (annexe A1-3);
- Puis une contamination au cuivre avec une solution de  $\text{CuCl}_2$  (annexe A1-4) a été réalisée sur les deux tiers des échantillons, pour chaque pH et chaque contenu en MO, à des concentrations respectives de 250 mg/kg et 750 mg/kg. Un tiers des échantillons n'a subi aucune contamination au cuivre.

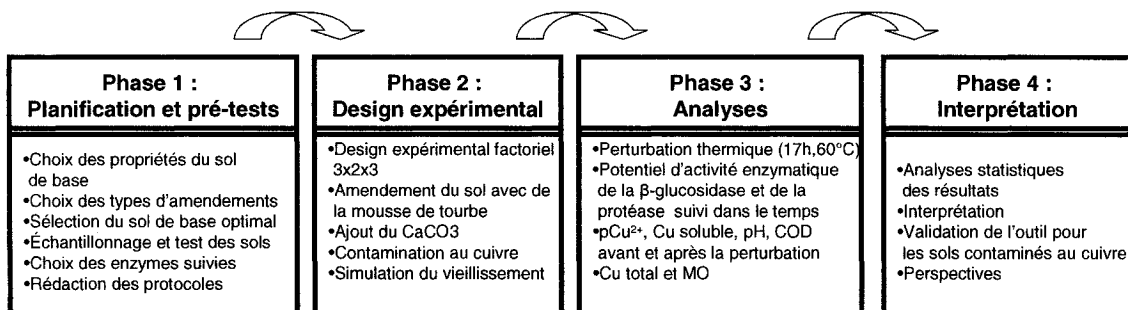
La Figure 3.1 représente le design expérimental défini pour cette étude.



**Figure 3.1 : Design expérimental des différents échantillons générés à partir du sol de base (M.O.= 27 g MO/kg sol sec, pH= 5,6)**

Le matériel et les méthodes utilisés pour préparer les différents échantillons de sol représentés à la figure 3.1, ainsi que pour effectuer les différentes analyses enzymatiques et chimiques sont disponibles à l'annexe II. La description de la chronologie des analyses se trouve à la section 4.2.4.4 ainsi qu'à l'annexe A5-5.

L'approche méthodologique adoptée afin de valider ou d'invalidier l'hypothèse de base se résume en quatre phases : 1) la planification et les pré-tests, 2) le design expérimental, 3) les analyses et 4) l'interprétation et les perspectives. Les principales tâches à réaliser au cours des quatre phases sont résumées à la figure 3.2.



**Figure 3.2 : Représentation schématique des principales étapes de l'approche méthodologique adoptée**

Une brève description des différentes étapes de chacune des phases ainsi qu'une brève justification des choix qui ont été faits lors du projet de recherche sont présentées ci-dessous :

#### 1) La planification et les pré-tests

Cette phase permet d'établir les bases du projet, de définir la méthodologie à adopter et de préparer le matériel nécessaire à la réalisation de la recherche. Le pH et la matière organique sont les variables contrôlées qui ont été choisies en plus du contaminant étudié i.e. le cuivre. Ces choix ont été faits en se basant sur la littérature : le pH et la matière organique sont les propriétés du sol qui ont la plus forte influence sur la spéciation du cuivre (McBride *et al.*, 1997). Le cuivre, pour sa part, est l'un des métaux ayant la toxicité la plus élevée pour les microorganismes du sol (Baath, 1989).

Les différents niveaux de matière organique choisis sont : 27 g MO/kg sol sec (*L*), 57 g MO/kg sol sec (*M*) et 78 g MO/kg sol sec (*H*). Étant donné qu'il est plus facile d'amender en matière organique que de réduire le contenu de MO d'un sol, le sol de



base devait contenir entre 15 et 30 g MO/kg sol sec. En effet, le sol devait contenir assez de MO pour soutenir une activité microbienne suffisante, mais aussi avoir un contenu en MO assez faible pour permettre deux amendements successifs de MO tout en restant en deçà de 100 g MO/kg sol sec. De plus, il est recommandé d'utiliser un sol ayant un contenu en matière organique d'au moins 20 g MO/kg sol sec pour tester l'impact des métaux dans les sols (McLaughlin *et al.*, 2002). L'amendement en MO a été effectué avec de la tourbe de sphaigne (Dobran *et al.*, 2005, Balasoiu *et al.*, 2001). Ce type de matière organique possède un ratio C/N d'environ 65 et une proportion en matière humique d'environ 20% (Dobran *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le pH du sol devait être assez acide pour obtenir un écart de pH suffisant entre les échantillons acides et neutres, car l'ajout de  $\text{CaCO}_{3(s)}$  ne peut augmenter le pH au-delà de 7-7,5. La quantité de  $\text{CaCO}_{3(s)}$  qui a été ajoutée lors des traitements de sols a été déterminée à l'aide de pré-tests (annexe A1-3). Ainsi, pour chaque contenu en MO une partie des échantillons était acide (*a*) et une partie a été modifiée pour atteindre un pH neutre (*n*).

Les niveaux de cuivre ont été choisis en fonction des règlements sur les sols contaminés en vigueur au Québec. En effet, les concentrations de 250 et 750 mg de Cu/ kg de sol sec représentent les plages situées entre les critères B-C et C-2C respectivement (Gouvernement du Québec, 1999).

Les enzymes choisies sont la protéase, l'arylsulfatase et la  $\beta$ -glucosidase. Celles-ci ont été sélectionnées en fonction de la littérature (voir par exemple (Bandick et Dick, 1999;

Effron *et al.*, 2004)) et de la simplicité des essais (McGrath *et al.*, 2002). Des tests préliminaires avec et sans tampon ont aussi été effectués afin de vérifier la différence du niveau de la réponse enzymatique et de vérifier si l'activité des enzymes mesurée sans tampon était quantifiable.

## 2) Le design expérimental

Cette phase inclut toutes les manipulations pour le traitement des sols selon le design expérimental choisi. Les différents traitements des sols (pH, MO et Cu) sont décrits dans les protocoles expérimentaux en annexe 1 (voir A1-1 à A1-4).

## 3) Les analyses

La planification temporelle des différentes analyses ainsi que les méthodes utilisées sont regroupées dans le protocole A1-5 à l'annexe 1. Globalement, les analyses de la  $\beta$ -glucosidase (annexe A1-6), de l'arylsulfatase (annexe A1-6) et de la protéase (annexe A1-7) ont été faites sur une période de 4 jours débutant immédiatement après l'application de la perturbation thermique (17h, 60°C). Les échantillons ayant subi les mêmes traitements de pH et de MO (e.g. *La*) ont été analysés simultanément. Certaines propriétés chimiques ont été mesurées avant et après la perturbation (pH, COD, Cu soluble,  $pCu^{2+}$ ).

## 4) L'interprétation et les perspectives

L'analyse des résultats à l'aide de régressions simples n'a pas été possible ni pour l'activité enzymatique seule, ni pour les RSSI calculés à partir de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase. À la place, une ANOVA factorielle des variables

contrôlées a été faite pour voir si chacun des traitements affectait significativement les RSSI de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase. Afin de valider les hypothèses de normalité et d'homogénéité de la variance, les valeurs ont été transformées et les résultats provenant des sols à 750 mg de Cu/kg de sol sec ont été rejetés. Une transformation  $\log(x+1)$  a été effectuée sur les résultats RSSI des deux enzymes à 0 et 250 mg de Cu/kg de sol sec.

Les analyses statistiques ANOVA qui ont été faites pour le RSSI de la protéase et de la  $\beta$ -glucosidase considèrent les traitements effectués sur le sol selon un design factoriel  $3 \times 2 \times 2$  et les niveaux de MO, pH et Cu ont été codés avec des variables de type *dummy*. Afin, d'approfondir les relations entre les résultats du RSSI des deux enzymes et les propriétés chimiques des différents échantillons traités, des analyses des composantes principales (APC) ont été effectuées. Pour ces analyses, les valeurs de pH, de COD, de cuivre soluble et de  $pCu^{2+}$  mesurées après la perturbation ont été utilisées. Les mesures de SOM et de Cu total pour chaque traitement ont aussi été utilisées. Ce type d'analyse statistique permet de réduire le nombre de dimension et d'agréger un grand nombre de résultats en transformant les variables mesurées en vecteurs. Ceci facilite l'interprétation, mais traduit les résultats sous un format plus qualitatif. Les résultats des analyses statistiques et des tests d'hypothèses sont présentés à l'annexe 2.

## **Chapitre 4      L'utilisation d'une approche basée sur la stabilité fonctionnelle (RSSI) pour évaluer l'impact du cuivre sur la santé des sols**

### **4.1 Présentation de l'article**

Le chapitre 4 reproduit le contenu d'un article soumis à Environmental Toxicology and Chemistry sous le titre de : « Use of an enzyme activity-based stability index (RSSI) to evaluate the impact of copper on soil health ». Les auteurs pour cet article sont Marylène Dussault, Valérie Bécaert, François Matthieu, Sébastien Sauvé et Louise Deschênes.

Cette étude a été conduite en laboratoire afin de valider l'outil RSSI, récemment développé par Valérie Bécaert à travers ses études doctorales, dans le contexte des sols contaminés par le cuivre en évaluant l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase. Les données brutes obtenues sont rapportées à l'annexe 3. Cette étude n'a pas permis de valider si le RSSI pouvait distinguer les différents niveaux de Cu, car les données pour les sols contaminés à 750 mg de Cu/kg de sol sec ont dû être retirées des analyses statistiques. Des détails supplémentaires sur les analyses statistiques sont présentés à l'annexe 2. De plus, les courbes d'activité enzymatique des sols à 750 mg de Cu/kg de sol sec sont présentées à l'annexe 4.

Dans cette section, après un court résumé, une partie de l'article présente les enjeux du développement d'un indice afin d'évaluer la santé des sols et la problématique quant au

choix d'un indicateur adéquat pour évaluer la santé des sols contaminés au cuivre. Plus particulièrement, cette partie met en lumière les difficultés inhérentes à l'utilisation de l'activité enzymatique comme indicateur. Ensuite, la méthodologie adoptée pour évaluer les propriétés chimiques et l'activité des enzymes des sols (suivie dans le temps) suite à une perturbation thermique (17h, 60°C) est survolée. Les analyses statistiques effectuées sont aussi rapportées dans cette partie. Par ailleurs, les protocoles expérimentaux détaillés sont présentés à l'annexe 1. La partie suivante présente les résultats et une discussion. Les résultats mentionnés dans l'article qui ne sont pas présentés (voir section 4.2.5.1) sont disponibles à l'annexe 4. Les résultats présentés dans cet article permettent de montrer que le RSSI basé sur la protéase détecte la présence de cuivre dans le sol. Par contre, le RSSI de la  $\beta$ -glucosidase n'a pas permis de détecter un impact relié à la présence de cuivre dans tous les sols. Par ailleurs, les résultats pour les deux enzymes ont permis de montrer que l'utilisation du RSSI de l'activité enzymatique permet de s'affranchir de l'influence du pH. De plus, l'indice est relatif et donc permet d'évaluer sur une même base des sols ayant des activités intrinsèques différentes. Finalement, l'article conclut que le RSSI est un outil intéressant et que le RSSI de la protéase semble adapté à l'évaluation de la santé des sols contaminés par le cuivre.

## **4.2 Use of an enzyme activity-based stability index (RSSI) to evaluate the impact of copper on soil health**

### **4.2.1 Abstract**

Soils are of major importance in maintaining terrestrial ecosystems' functions. Copper as a pollutant can affect essential processes in soil, often for long periods. Enzyme activity is considered a sensitive index to evaluate soil health. On the other hand, the heterogeneity of enzyme activity assays raises questions about the limitation of such indices. Moreover, in metal contaminated soils, the influence of pH on both enzyme activity and metal speciation leads to complications when comparison are needed and limit the validity of the results. To overcome these problems, this paper suggests to monitor the impact of a heat-perturbation (17h, 60°C) on soil  $\beta$ -glucosidase and protease activities over time (4 days). This investigation of the functional stability of a soil to which soil organic matter, pH and Cu content were modified integrates the concepts of resistance and recovery that were quantified using a relative soil stability index (RSSI). Chemical analyses (dissolved Cu,  $pCu^{2+}$ , dissolved organic carbon, pH) were performed both before the heat perturbation and after the enzyme activity monitoring period. Results show that RSSI scores of both enzymes were independent from soil pH.  $\beta$ -Glucosidase RSSI scores were scarcely affected by copper, making it inappropriate for evaluating stress induced to soil by copper. It was, however, strongly correlated with SOM. On the other hand, protease activity shows stimulation of up to 2.5 times the activity of the unperturbed control in uncontaminated samples only. Thus,

protease RSSI scores seem as a good indicator for copper contamination since all samples were affected by the presence of copper and high correlations were observed between RSSI scores and the different copper forms.

#### **4.2.2 Keywords**

Protease,  $\beta$ -glucosidase, soil health indicator, copper, soil contamination, speciation, enzyme activity, heat perturbation, functional stability.

#### **4.2.3 Introduction**

Soils are an important resource supporting the entire terrestrial ecosystem. Soils play numerous roles in supporting life: e.g. as a medium for plant growth, to maintain environmental quality and to promote plants and animal health [1]. In recent years, it has been recognized that soil is not an inexhaustible resource and that it may, if inappropriately used or mismanaged, rapidly be lost [2].

The development of methods to evaluate soil quality has become an important issue. This has however proven to be difficult. Indeed, soil is a complex, dynamic, living, natural entity and represents complex equilibria between physical, chemical and biological factors [3]. The multiplicity of these factors, which control biogeochemical processes, and their spatial and temporal variability, makes it difficult to assess soil quality and to identify key soil properties that could serve as useful indicators [4].

Soil degradation can be caused by the presence of anthropogenic substances (organic or inorganic pollutants) and soil mismanagement. While most organic pollutants can eventually be biodegraded by indigenous soil microbes, inorganic pollutants are by

default persistent. For example, once trace metals enter a soil, they will never be degraded and for elements, the residence half-life before they leach or move away can extend to several thousand years [5].

Metals at high concentration in soils are toxic. Some trace elements, like copper, are essential nutrients. On the other hand, copper is also a well-known fungicide and has frequently been reported as one of the most toxic metals to soil microorganisms and soil health [6]. Dumestre *et al.* (1999) showed that the mineralization processes and the global microbial structures of 20 soils sampled from two different agricultural sites were still affected by copper contamination after 50 years. Moreover, Sauvé (2006) shows that 285mg Cu/kg dry soil from a seventy-year old copper contaminated site resulted in a 50% inhibition effect on soil organic matter (SOM) degradation.[7].

It is known that soil has the capacity to buffer the effects of contamination or of mismanagement. The complex dynamic nature of soil complicates the detection of the signs of potentially damaging conditions or misuse of soils because it is difficult to distinguish between changes resulting from natural evolution and changes from external and damaging sources [2]. For this reason, it is essential to develop soil quality assessment methods that are both sensitive to small variations and able to distinguish between natural variations and soil degradation.

Indicators based on physical and chemical properties can provide much information on soil attributes. In comparison, biological indicators provide more integrative information on the sustainability of essential soil functions [8]. Many studies have tried



to assess the impact of metallic pollutants on soil microorganisms by monitoring their activity and processes (e.g. enzyme activity, respiration, microbial biomass see e.g. [9-11]). The enzymes secreted by the soil microbial community are often reported as an excellent candidate for the development of a soil quality index [12-14]. They may also respond more quickly to small biological changes in soil quality than other soil variables and thus be useful early indicators [15]. Soil enzymes possess these qualities mainly because they play a central and crucial role in nutrients cycling and thus on the sustainability of the ecosystem [16]. Indeed, a change in enzyme productivity caused by a change in the environment can affect the ecosystem processes directly [17].

$\beta$ -Glucosidase and protease are key enzymes in the C and N cycles, respectively. Monitoring of  $\beta$ -glucosidase activity in soil has been widely used (see e.g.[4, 13, 14, 18]) and has been recognized as a good indicator of soil quality [15, 19, 20]. Protease, for its part, is rarely used as soil quality indicator. It is, however, a rate-limiting enzyme in nitrogen mineralization processes [21], and it has been reported as a good indicator of the impact of trace metals in soils [11].

While soil enzyme activity seems to be an ideal candidate for the role of a soil health index, the lack of standardization of enzyme activity methodologies makes comparison between different studies difficult [22]. Even if standardized methods were introduced, cross-study comparisons would remain problematic because of the role of pH in the measurement of enzyme activity. Three effects of pH are especially problematic: (1)

pH controls the rate of the enzyme-substrate reactions; (2) it controls the speciation of copper; and (3) it controls the solubility and adsorption of organic matter.

In order to deal with the first issue, buffer solutions are widely used in enzyme activity testing. This ostensibly allows the measurement to be taken at the optimum pH for this enzyme-substrate reaction, which does facilitate the detection of inhibition. However, there are various problems in the determination of the optimum pH and consequently in the choice of the buffer, most notably: (i) the presence of Cu in the soil shifts the pH optimum of the enzyme-substrate reaction [23]; (ii) the same enzymes coming from different *sources* will have different kinetics, which means that the optimum pH for a soil will vary spatially and temporally and is directly linked to the types and proportions of enzyme sources in a specific soil [16]; and (iii) the *type* of buffer used can affect the activity of enzymes [23].

The second effect of pH is on the speciation of metals such as Cu. A change in pH will affect the chemical equilibrium and thus the proportion of copper forms in soil varying from highly soluble forms to immobilized or inert fractions[24]. The speciation of copper is important because it affects soil enzyme activity by (i) a toxic effect, related to both the bioavailability and intrinsic toxicity to microorganisms and (ii) chemical interactions with the enzymes in the soil. It can inhibit enzyme activity in many ways: (i) by reducing the production of enzymes by its toxic effect on soil microflora, (ii) by combining with the protein active groups of the enzyme, (iii) through complexation of the substrate and (iv) by reacting with the enzyme-substrate complex [16].

The third effect of pH is on organic matter. SOM offers adsorption sites in the solid and solution phases of the soil. Since protons compete for these sites, site availability is pH dependent. Release of dissolved organic carbon (DOC) is also dependent on pH. Adsorption sites provided by both SOM and DOC are important in insuring protection and stability for enzymes [25]. In addition, DOC can increase copper mobility and bioavailability [26].

Overall, pH is of major importance in soils and controls many other properties and equilibria in soil. This puts a damper on the obvious advantages of using a buffer.

The numerous properties, due to both spatial and temporal soil heterogeneity, that influence enzyme activity result in natural wide variations and in a lack of control. Thus, several authors are preoccupied that individual enzyme activity may be seriously limited as an indicator of soil quality (see [8] for a review). Dick (1997) suggests overcoming this problem by using internal or relative soil enzymes indices that are independent of soil treatments.

An increasingly attractive way for evaluating soil quality is the use of a tool based on soil function stability [8]. Functional stability combines the concepts of soil resistance and recovery [27], which are key characteristics of ecosystems. Simply put, soil health has been defined as the capacity of soil to function [28]. Hence, considering soil as an ecosystem in itself, a healthy soil must be able to show stability towards a variety of stresses. In reality, soils commonly undergo stresses from a diversity of sources: natural stresses (e.g. drought, freeze/thaw, fire) and anthropogenic stresses (e.g.

organic/metallic contamination, tillage, plough). The functional stability of a disturbed soil process is best considered by comparing its performance relative to that of an undisturbed soil [29]. Some studies applied various types of disturbances to soils, and then measured the change in the stability of a soil function [30-33]. Assessment of a soil function can be monitored using any relevant soil biological or biochemical properties. A Relative Soil Stability Index (RSSI), recently proposed by Bécaert *et al.* (2006), was used to investigate the impact of 2,4-D on soil functional stability. The comparison of the evolution of enzyme activities of contaminated and uncontaminated soil samples, allowed them to evaluate the impact of the contamination on the soil's capacity to resist and recover from a heat stress.

In this work, the effect of copper contamination on soil health is evaluated using an approach similar to that of Becaert *et al.* (2006). However, attention will be given to the biochemical relationships between different soil properties. The first objective of this article is to validate the use of the RSSI to assess the impact of a metallic compound (copper) on soil health. The second objective is to see if such an approach allows the impact of copper on enzyme activity to be decoupled from the effect of changes in chemical properties (e.g. pH); this could eventually lead to an alternative soil health indicator that allows comparativeness of results between studies.

#### 4.2.4 Materials and methods

##### 4.2.4.1 Soil

The soil used (30 kg) was a top soil (0-20 cm) from the experimental farm of the Macdonald Campus of McGill University located in St-Anne-de-Bellevue (Montreal, QC, Canada). The soil was sieved through 2-mm mesh and stored at room temperature in plastic containers. The soil was a loamy sand containing 88 % (w/w) sand, 8% (w/w) silt and 4 % (w/w) clay. Soil organic matter content (SOM) was  $27 \pm 0$  g OM/kg dry soil [34], water holding capacity (WHC) was of 37% water content [35] and soil pH = 5.6 (Orion SureFlow semi-micro Ross combination pH electrode) measured according to method D4972 [36]. ICP scanning of 20 trace elements (according to SM 3120B [37]) was used to insure the absence of metallic contamination in soil. No trace element concentrations were above normal background levels as determined in Quebec provincial regulations [38]: copper concentration was 5  $\mu\text{g/g}$  dry soil.

##### 4.2.4.2 Experimental design: Soil pH and organic matter

Amendments to the initial soil (pH = 5.6 and SOM = 27 g OM/kg dry soil) were performed according to a factorial experimental design of 3 fixed factors (SOM, pH, Cu content). The design was composed of 12 different final amended soils with three different SOM contents (27, 57 and 78 g OM/kg dry soil), two pH levels (acidic and neutral) and two levels of Cu (uncontaminated and 250 mg/kg Cu). Final soils with the same SOM and pH were grouped for simultaneous analysis and will be referred as soil treatments.

Peat moss (Berger Peat Moss Ltd.) was added to the initial soil in order to reach the 3 different SOM levels. The peat moss was previously washed, in order to lixiviate excess salts and humic acids. It was then air dried and sieved ( $< 2$  mm). Modifications of pH were done in order to reach a neutral pH by amendments of 1% (w/w) of  $\text{CaCO}_3(\text{s})$ . For both latter amendments, samples were divided in 1 kg (dry weight) sub-samples and placed in 2-L HDPE containers which were then treated, homogenized on a rotary agitator at 50 rpm for 24h, recombined as a sample and manually homogenized. Levels of organic matter of the samples will be referred as *L*, *M* and *H* (Low = 27 g OM/kg dry soil, Medium = 57 OM/kg dry soil and High = 78 OM/kg dry soil) and the pH will be referred to as *a* (acidic) and *n* (neutral) – see Table 4.1. The pH of all final soils was measured after the amendments. Acidic soil treatments pH range between 4.5-5.2, whereas neutral soil treatments pH range between 7.3-7.5.

**Table 4.1 : Soil treatments identification**

Sol treatments	SOM (g OM/kg dry soil)	pH
<i>La</i>	27	acidic
<i>Ln</i>	27	neutral
<i>Ma</i>	57	acidic
<i>Mn</i>	57	neutral
<i>Ha</i>	78	acidic
<i>Hn</i>	78	neutral

#### 4.2.4.3 *Experimental design: Copper spiking*

The six soil treatments were subdivided in two subsets. One was spiked using a 0.5 M  $\text{CuCl}_2$  salt solution in order to attain 250 mg/kg of Cu (contaminated samples). The other was normalized with a 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  solution in order to standardize the presence of the counter ion  $\text{Cl}^-$  (uncontaminated samples). The 250 mg Cu/kg level represents the middle value between soil quality criteria B and C from applicable Quebec regulations for contaminated sites. Criteria B represent the maximal acceptable concentration of copper allowed for residential site and criteria C is the maximal concentration of copper concentration allowed in industrial sites [38]. Wetting and drying cycles were then applied on treated soils in order to simulate ageing of the copper contamination. Following the addition of the solutions, spiked soils were homogenized on a rotary agitator at 50 rpm for 24h and placed as thin layers (< 3 cm) in pyrex plates in preparation for the wetting and drying cycles (three cycles performed). The WHC was measured for each of the twelve final soils using the method described earlier. For each wetting, soils were brought to 92 % of their WHC using Millipore water and then air-dried for 6 days. After 3 cycles, air-dried soils were leached in order to simulate a scenario “where weathering and dissolution processes release the toxic ingredient from a sparingly soluble substance” [39]. To do so, soils were place in ABS tubes (17.9 cm diameter) where one end was covered by a geotextile membrane, allowing water to run through and retaining the fine soil particles. The tubes were then

laid on a bed of Ottawa sand to facilitate percolation of lixivate. Millipore water was added at a ratio of 1:1 (w/w) in regards to soil dry weight. Lixivate percolated throughout overnight. Samples were then air-dried, homogenized and stored at room temperature for at least 2 weeks before starting the analyses. Samples were all treated simultaneously, so storage period varied for each soil types (same pH and SOM). Total copper (ICP-AES) for each sample was analyzed after the above treatment using boiling aqua regia extraction. The copper concentration of uncontaminated samples (on dry soil basis) ranged between 3.0 to 5.8 mg/kg, whereas that of contaminated soils ranged between 220 and 230 mg/kg.

#### 4.2.4.4 *Timeline of experiment*

Six microcosms for each final soil were prepared for the experiment. The microcosms consisted of 100 g of soil in 1 liter glass jars. The soils were kept at 60 % of their WHC in the dark at room temperature before and after the heat perturbation treatments. Half the microcosms were thermally perturbed by heating them to 60°C over 17 hours, mimicking a heat wave or a fire of moderate intensity [30]. The perturbation was applied on both contaminated and uncontaminated microcosms. The other half of the samples were unperturbed.

Before the heat-perturbation, extractions were conducted on samples from all soil microcosms in order to perform chemical analyses (free copper, soluble copper and DOC, see *Chemical analysis* section for details). Immediately after the heat-perturbation (day 1) microcosms were cooled down to room temperature and brought



back to their initial water content. On the same day, potential enzyme activity analysis of  $\beta$ -glucosidase and protease were conducted on all microcosms (unperturbed and heat-perturbed). Monitoring of enzyme activities were performed once a day throughout a 4-day period. The final duration of the assays was chosen according to Pearson's correlation coefficients calculated on 227 15-d assays [40] which showed that Relative Soil Stability Index results (see *Relative Soil Stability Index (RSSI) calculation*) calculated on 15-d and 4-d monitoring periods were well correlated for all samples and enzymes tested ( $p=0.960$ ). These various assays were performed on different soils and different enzyme activities, including protease and  $\beta$ -glucosidase. Finally, on day 5, the chemical analyses, performed before the heat perturbation, were repeated on all microcosms.

#### 4.2.4.5 Enzyme assays

Enzyme assays were conducted following published methodologies with the exception that no pH buffers were used. This choice was made in regards of the problems generated by the use of buffers when assessing the impact of metal contamination on the enzyme activity of soil (see introduction).

The activities of  $\beta$ -glucosidase was assayed on 1 g soil samples mixed with 4 ml Millipore water incubated for 1 h at 37°C after the addition of 1 ml of the enzyme-specific substrate solution [41]. The substrate for  $\beta$ -glucosidase was *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (25 mM). Reactions were stopped by the addition of 1 ml of 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  and the *p*-nitrophenol released was extracted with 4 ml of 0.5 M NaOH. *p*-Nitrophenol was

recovered after filtration through a 0.45 µm PVDF Millipore-Millex filter and its content was determined colorimetrically at 420 nm. All measurements were performed in duplicate.

Soil protease activity was determined using a casein solution (2% w/v) as substrate [42]. Soil samples (1 g) were incubated at 50°C for 2 h. Amino acids released during the incubation were extracted, and the remaining substrate was precipitated following the addition of trichloroacetic acid. Aromatic amino acids reacted with Folin-Ciocalteu's phenol reagent in alkaline solution to form a blue complex which was measured colorimetrically at 700 nm.

#### *4.2.4.6 Chemical analyses*

Water extractions were conducted on 10 g dry soil in 500 mL centrifugation tubes using 40 mL of Millipore water. The soil suspensions were shaken with a “wrist action” shaker for 2 h to equilibrate and centrifuged at 8000 rpm for 15 min. Supernatant was filtered through a 0.45 µm PVDF Millipore-Millex filters. Solutions obtained were then separated and treated in regards to the chemical analysis (free copper, soluble copper and dissolved organic carbon (DOC)). First, 10 mL were kept for DOC measurements, which were performed using a total organic carbon combustion analyzer (Shimadzu - 5000, Kyoto, Japan). Then, 15 mL of the filtrate was adjusted to reach a 0.5 mM Na<sub>4</sub>EDTA (Sigma, SigmaUltra E5391) solution, which was stored at 4°C and latter analyzed for Dissolved Cu (DCu). DCu was measured by ICP-AES. Finally, an aqueous solution of KNO<sub>3</sub> (Fluka, biochemika 60414) was added to 15 mL of the filtrate to

reach a 0.01 M KNO<sub>3</sub> solution, which was immediately analyzed for free copper activity (pCu<sup>2+</sup>) using a copper ion selective electrode (Thermo ionplus sure-flow cupric Orion 9626BN). The electrode was calibrated using IDA calibration buffers [43].

#### 4.2.4.7 RSSI Calculation

The RSSI is a comparison of the potential capacity of enzymatic transformations of a perturbed soil with that of the same but unperturbed soil [30]. The RSSI scores used in this study were calculated by dividing the value of the area under the curve of the enzyme activity between day 1 (immediately after perturbation) and day 4 for the perturbed soil by the value of the area under the curve of the enzyme activity between day 1 and day 4 of the unperturbed soil (equation 4.1).

$$\text{RSSI} = \frac{\int_{\text{Day1}}^n EA_{\text{perturbed}}(t) dt}{\int_{\text{Day1}}^n EA_{\text{unperturbed}}(t) dt} \times 100\% \quad \text{Equation 4.1}$$

RSSI scores calculated using equation 4.1 represent the magnitude of the impact of the heat-perturbation on the capacity of the soil to function. More specifically, the potential of the soil to transform a quantity of substrate through time after a heat-perturbation is evaluated in regards to the quantity of substrate that the same soil would be able to transform if no perturbation was applied. Moreover, the RSSI is dimensionless, which allows comparisons between different soils.

#### 4.2.4.8 Statistical analysis

All statistical analyses were done using Statistica© V.7.1. RSSI results were analyzed by ANOVA factorial analysis with mean values compared using a LSD test ( $p < 0.05$ ). The results were transformed ( $\log(x+1)$ ) in order to respect the assumptions of normality and homogeneity across variance of the tests. Random protease measurements were rejected in order to balance the data set. The relationships between the RSSI scores and chemical soil properties were submitted to further investigation using principal component analysis (PCA).

### 4.2.5 Results and discussion

#### 4.2.5.1 Enzyme activity: Impact of copper contamination

For each soil treatment, the uncontaminated and contaminated soil enzyme activity results were plotted against time (results not shown). The enzyme activities of protease and  $\beta$ -glucosidase were monitored through a 4-d period, which resulted in graphs of 4 points curves per enzyme for each of the different soil treatments (same pH and same SOM). Interpretation of the curve tendencies in regards to the different variables was not intuitive. Daily variations in enzyme activity, in addition to uncertainty (whose importance also varied widely through the monitoring period), resulted in significant differences between contaminated and uncontaminated soils on some days and not on others. Another problem encountered was that the impact of copper on the enzyme activities was different between final soils and could not be classified easily as a function of soil pH, SOM content or Cu levels.

In order to take into account interactions between chemical properties and the related variations in toxicity, enzyme activity was plotted against free copper activity, which is an integrative property that is both affected both by SOM and pH (Figure 4.1). To help the distinction between the different plots presented in Figure 4.1, the samples were grouped according to pH and Cu levels. Figures 4.1-A and 4.1-B show  $\beta$ -glucosidase and protease activity integrated over the monitoring period against free copper activity, respectively. For  $\beta$ -glucosidase activity, no relationship could be drawn from the graph. It can be supposed that other soil properties affect the enzyme activity and a more holistic evaluation is needed. For protease, the relationship seems more as expected, i.e. protease activity decreases when free copper activity increases. This could be expected since  $pCu^{2+}$  is recognized as the most toxic forms of copper. Still, the graph shows some counter-intuitive results: for example, the protease activity of the contaminated neutral samples is significantly higher than that of the uncontaminated acidic samples. These results show that  $pCu^{2+}$  concentrations alone cannot explain the enzyme activity variations, and suggest that other important relationships exist between enzyme activity and important soil chemical properties.

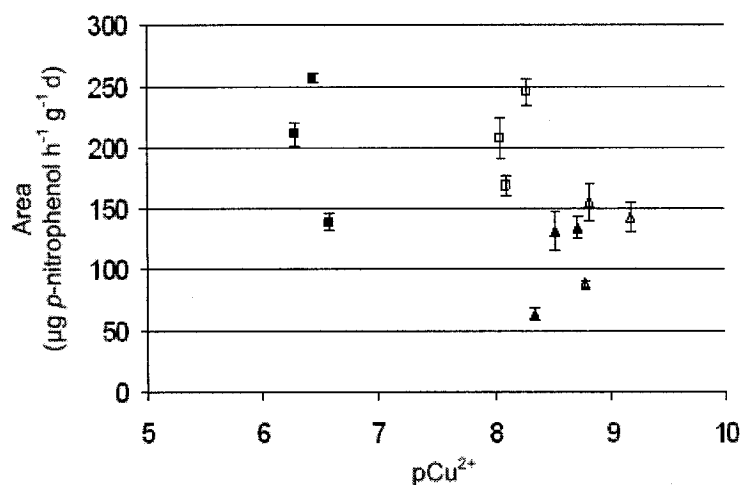


Figure 4.1-A:  $\beta$ -glucosidase activity vs. free Cu activity

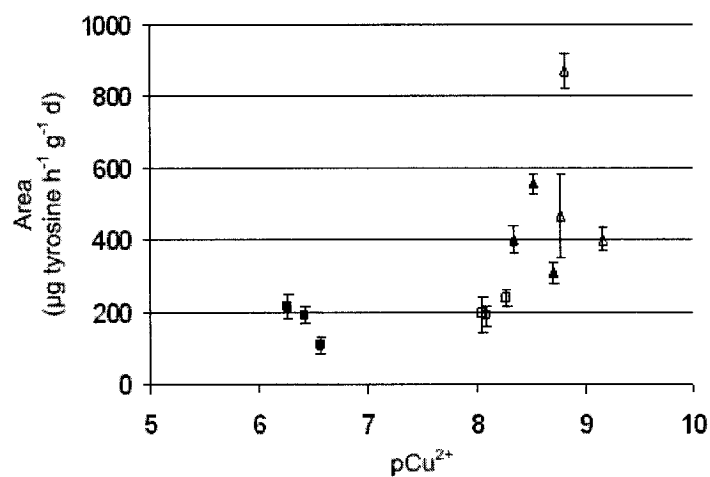
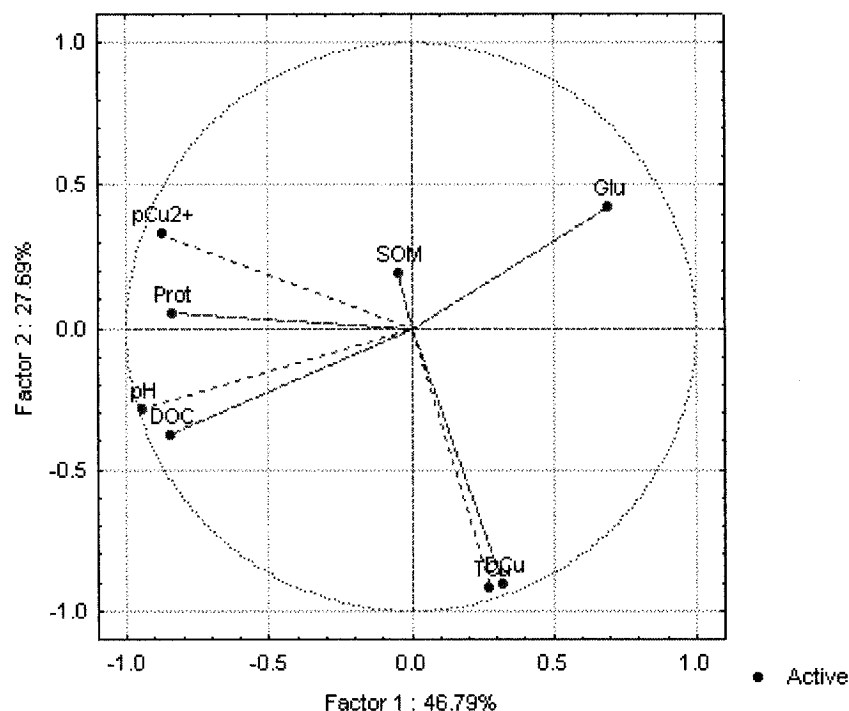


Figure 4.1-B: Protease activity vs. free Cu activity

**Figure 4.1: Relationship between enzyme activity and free Cu activity.**  $\beta$ -Glucosidase (4.1-A) and protease (4.1-B) activities integrated over 4 days plotted against free copper activity ( $pCu^{2+}$ ). Squares represent acidic soil samples (*La*, *Ma*, *Ha*) and triangles represent neutral soil samples (*Ln*, *Mn*, *Hn*). The empty symbols represent the uncontaminated samples and the plain symbols the copper contaminated samples. Error bars represent standard deviation over 6 samples.

#### 4.2.5.2 Enzyme activity: Influence of chemical properties

In order to investigate the relationships between chemical properties and the activity of both enzymes, a principal component analysis (PCA) was conducted. The first three factors of the PCA explained 93.7% of the variation. Figure 4.2 shows a projection of the variables on the factorial plane (1,2), which presents 74.5% of the total variation. A strong correlation can be observed between the first factor and: pH (-0.95), DOC (-0.85), free copper (-0.87),  $\beta$ -glucosidase (0.70) and protease (-0.84). It is in accordance with the known influence of pH on enzyme activity, DOC and free copper. In addition, in our range of slightly acidic to neutral soil pH, protease activity is indeed positively correlated with pH since its optimum pH is, according to literature, 8.1 [25], whereas  $\beta$ -glucosidase, whose optimum pH is 6.0 [41], shows negative correlation to pH.



**Figure 4.2 : Principal Component Analysis (PCA) on  $\beta$ -glucosidase and protease activities and soil chemical properties. Protease (Prot) and  $\beta$ -glucosidase (Glu) activities are represented as the area under the curve of the 4-days follow up. Copper species are represented by total copper (TCu), dissolved copper (DCu) and  $\text{Cu}^{2+}$  activity (pCu<sup>2+</sup>). Soil organic matter (SOM), pH and dissolved organic carbon (DOC) are also shown.**

Total copper (TCu) and dissolved copper (DCu) are the major variables which correlate with the second factor (respectively -0.92 and -0.90), explaining 27.7% of the variability. All other variables show a weak correlation ( $<0.50$ ) to the second factor. SOM is poorly correlated to both the first and the second factors (respectively -0.05 and -0.19). However it is strongly and almost uniquely correlated with the third factor (-



0.97), which explains 19.2% of the variability (results not shown).  $\beta$ -Glucosidase shows a weak positive correlation to SOM, correlating with -0.56 to the third factor.

These observations confirm that the assessed properties are all closely related and it highlights the difficulty that resides in assessing soil quality, i.e. interrelatedness. Factor 1, which can be related to a strong pH effect, factor 2, related to total Cu, along with factor 3, explaining variability induced by SOM, highlight the strong influences of these properties on soil enzyme activity and copper toxicity. According to the literature, those three properties of soils are the most important factors affecting dissolved metal concentrations, thus controlling copper mobility and availability (see [44] for a critical review).

The pH and SOM are commonly pointed out as the main soil properties influencing enzyme activity and micro-organism growth. However, in this study, correlations show that SOM seems to have a limited influence on enzyme activity. This could be explained by the role of pH as a controlling variable on metal complexation by SOM: consequently, there is no satisfactory way to decouple the effect of pH and of organic matter content on metal adsorption [45]. On the other hand, results show that pH has a strong influence on enzyme activity. This could be explained by the high dependence of enzyme-substrate reaction rates on pH. In the literature, the use of buffer has been touted as a means to ensure comparability of results between samples of different soil pH or different studies. However, by using a buffer when assessing enzyme activity, one may not only change the speciation of the metallic contaminant if the pH of the

buffer is different than that of the soil, but the chemicals constituting the buffer may also act as a ligand and reduce bioavailable copper species.

In addition, pH is known to influence the copper speciation (see e.g [24]), the degree of complexation of ligands [46] and DOC [47]. Not surprisingly, results show that  $pCu^{2+}$  and DOC were strongly correlated with pH. Copper has strong affinity for organic matter as a complexing agent [47]. Thus, the latter can also affect copper speciation and thus alter inhibition on enzymes.

Globally, the strong dependence of the assessed enzyme activities towards soil properties, in particular pH, makes detection of changes caused by anthropogenic sources (copper) almost impossible. This concurs with the conclusions of Smolder *et al.* for nitrification assays which were more dependent of soil properties like pH than contaminant levels [48]. Interrelations between physical, chemical and biological properties are such that a change in one property might induce a change in many others. Not using a buffer engenders other problems related to the dependence of pH that need to be standardized in some way or else the results from such studies would be of limited use.

#### 4.2.5.3 Enzyme activity: Impact of heat perturbation

$\beta$ -Glucosidase and protease activities show different reaction towards the heat-perturbation (17h, 60°C). Examples of enzyme activity in time for perturbed/unperturbed and contaminated /uncontaminated soils are shown in figure 4.3 for *Ha* and *Hn*  $\beta$ -glucosidase (respectively 4-3A and 4-3C) and protease (respectively

4-3B and 4-3D).

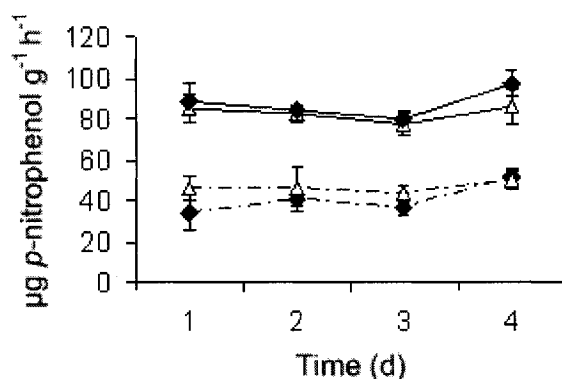


Figure 4.3-A

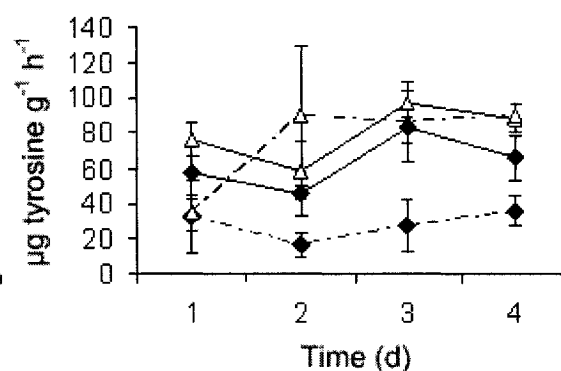


Figure 4.3-B

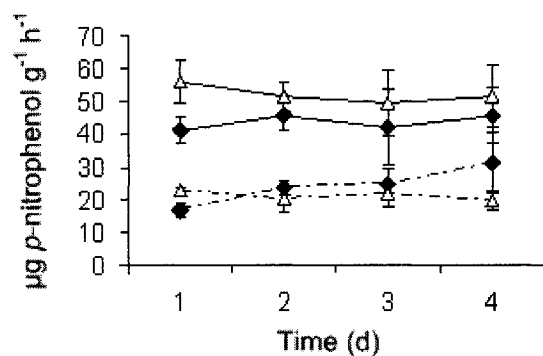


Figure 4.3-C

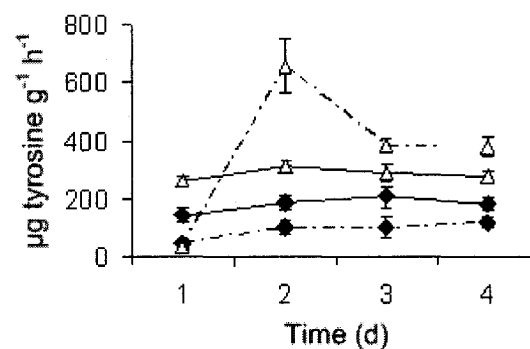


Figure 4.3-D

**Figure 4.3: Enzyme activity reaction to the application of heat-perturbation. Examples of enzyme activity curves for *Ha* (3-A and 3-B) and *Hn* (3-C and 3-D) are presented. Figures 4.3-A and 4.3-C show  $\beta$ -glucosidase monitoring over the 4 day period whereas figure 4.3-B and 4.3-D represent protease monitoring of the same soils respectively.  $\triangle$  symbols represent uncontaminated soil samples,  $\blacklozenge$  represent copper-contaminated soil samples, plain lines represent unperturbed samples whereas dashed lines represent perturbed samples. Error bars represent the standard deviation over 6 samples.**

Since enzyme activity is closely linked to the multiple processes of soil microorganisms, its measurement can potentially supply integrative information on the soil biological and physico-chemical conditions [4, 16, 19]. Globally, daily variations of enzyme activities were observed for all the samples. This variability within and between soils is often seen as a major limitation in using enzyme activity as soil health indicators [12]. Interestingly, the variation patterns observed for  $\beta$ -glucosidase activity (e.g. Figure 4.3-A and 4.3-C) is similar between the perturbed and the unperturbed soils that have the same characteristics. This seems to indicate that, despite the daily variations, the cause of variability is influencing samples in a similar way and, therefore, the natural variability could be taken into account when compared with the associated perturbed sample.

More specifically, the  $\beta$ -glucosidase activity in the uncontaminated soils is strongly affected by the heat-perturbation, dropping to about 50% of the paired unperturbed soil sample on the first day and remaining at that level for the entire 4-d monitoring period. This behaviour was also observed for the contaminated soils. Nonetheless, the perturbed enzyme activity of both contaminated and uncontaminated soils were not significantly different for most soil treatments, which casts some doubts as to whether copper actually impacted  $\beta$ -glucosidase activity stability.

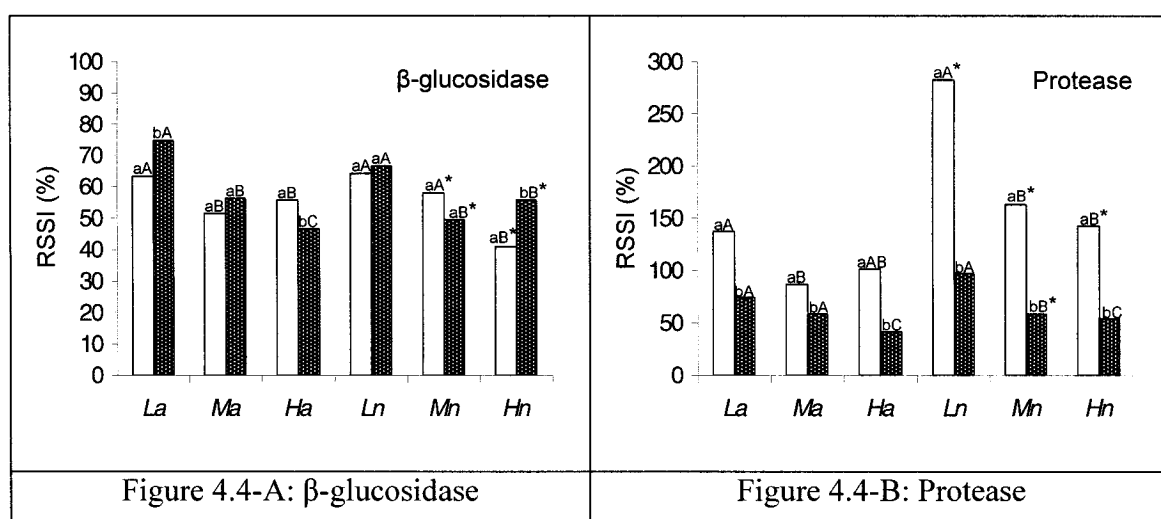
The protease activity of heat-perturbed uncontaminated soils, despite a strong activity decrease on the first day (immediately after perturbation), showed significant stimulation on the second day and maintained a high activity level on the following

days. This observation is more obvious for the neutral soils (Figure 4.3-D), where the stimulation can reach up to 2.5 times the activity of the unperturbed soil. Since protease is mainly an intracellular enzyme [16], this stimulation could be attributed to the release of intracellular protease following the lyses of microbial cells after the heat-perturbation. As for the protease activity in the heat-perturbed contaminated soils, no stimulation is observed between days 1 and 2. The presence of copper in the soil seems to change the normal activity-pattern of protease following a heat-perturbation. Effron (2004) reported that protease activity might be an ideal candidate as an index for metallic pollutants in soils since it has been shown to produce the highest percentage of inhibition in comparison to the other enzymes tested (arylsulfatase,  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase and urease) for all the doses of Cu and Pb [11]. In agreement with their conclusion, our results tend to reveal that protease activity, following a thermal shock, might be a more suitable index for the assessment of metal contaminated soils than  $\beta$ -glucosidase. However, in our case, this observation is mainly relevant in the comparison of the simultaneous analyses of a perturbed and unperturbed sample.

Evaluation of the enzyme activities after a heat-perturbation allowed qualitative information on the resistance and recovery capacities of the soil and on the potential impact of the presence of copper on these activities. In addition, variations induced by random influences and by the different properties of the samples could be separated by comparing the perturbed soil to an unperturbed control.

#### 4.2.5.4 Impact of copper contamination on enzyme activity stability

In order to evaluate the stability of the soil samples, the RSSI of  $\beta$ -glucosidase and protease were calculated for each soil treatment. They are presented in Figure 4.4-A and 4.4-B for  $\beta$ -glucosidase and protease, respectively.



**Figure 4.4: Factorial ANOVA analysis of  $\beta$ -glucosidase activity (4.4-A) and protease activity (4.4-B). Soil samples *L*, *M*, *H* refer to SOM level 27 g OM/kg dry soil, 57 g OM/kg dry soil and 78 g OM/kg dry soil respectively, whereas *a* and *n* refer to pH level acidic and neutral respectively. Light bands represent uncontaminated samples; dark bands represent copper contaminated samples. Calculations were based on 6 and 5 replicates of the unperturbed and perturbed samples for  $\beta$ -glucosidase and protease, respectively. Different lower case letters refer to significant differences between Cu treatments at same SOM and pH. Different capital letters refer to significant differences between SOM levels at same pH. Stars refer to significant differences between pH levels.**

The RSSI integrates information on resistance and recovery of the assessed soil functions. Also, RSSI scores reflect the percentage of activity that the soil is still able to accomplish after a perturbation through a defined period [30]. For example, *Ha* soil samples have significantly different RSSI scores for  $\beta$ -glucosidase of uncontaminated and contaminated samples (55.9% and 46.7%, respectively). This means that the contaminated *Ha* soil was able to do 46.7% of the substrate transformation that the associated unperturbed sample was able to do, whereas the uncontaminated *Ha* soil managed to do 55.9% of the substrate transformation it would have been able to do if no perturbation was applied. In this case, the presence of copper had a negative effect on the capacity of the soil to function. On the other hand, *La* and *Hn* contaminated samples showed significantly higher RSSI scores than their uncontaminated counterparts. This could be explained by the fact that the inhibitive effect of copper on  $\beta$ -glucosidase activity is similar to the inhibitive effect caused by the heat-perturbation. This implies that the use of  $\beta$ -glucosidase with heat-perturbation might not be appropriate for the evaluation of the impact of copper contamination on soil health.

As for protease activity RSSI, *Hn* scores for the contaminated and the uncontaminated soils are significantly different at 54.0% and 143.2%, respectively. RSSI scores of over 100% indicate that the perturbation stimulated the enzyme activity of the sample. Hence, the perturbation enabled the uncontaminated *Hn* soil to achieve more substrate transformation than if no perturbation was applied. The presence of copper in the contaminated *Hn* sample not only prevents this stimulation but actually inhibited

enzyme activity, the sample only achieving 54% of the substrate transformation associated with the unperturbed sample.

Globally, ANOVA results for the  $\beta$ -glucosidase RSSIs show no consistent significant differences between paired contaminated and uncontaminated soils. Significant differences in regards to the pH were observed for both mid (*Ma*, *Mn*) and high (*Ha*, *Hn*) SOM level soil treatments. ANOVA results for the protease RSSIs, however, show significant differences between associated contaminated and uncontaminated soils. For protease RSSI, there are also significant differences between pH for the uncontaminated samples, and between SOM levels for the contaminated neutral soils. Moreover, a decrease in the RSSI scores is observed for both enzymes in regards to increasing SOM contents. As SOM micro-aggregates formation is known to be a key stabilizing factor in soils [49], this observation might reveal a lack of aggregate formation in the soil amended with peat moss. This is quite probable, since conditions of the treated soil and the soil mixing were not favouring aggregate formations. For example, sieving and wetting and drying cycles might have been factors inducing aggregate breakdown (see [49] for a review). Nevertheless, it is interesting to note that this drop in stability was not observable with the traditional enzyme activity measurements. In fact, for  $\beta$ -glucosidase, the enzyme activity was positively correlated to SOM (Figure 4.2).

The relationships between the RSSI scores and chemical soil properties were submitted to further investigations using PCA (Figure 4.5). For PCA using  $\beta$ -glucosidase's RSSI, the first 3 factors explain together 93.0% of the variability. The projection variables on



factorial plane (1,3) appears in Figure 4.5-A. Factorial plane (1,2) was chosen not to be presented since  $\beta$ -glucosidase RSSI vector shows poor correlation with factor 2 (-0,27). However,  $\beta$ -glucosidase RSSI scores are correlated to the factor 3 with 0.76 and inversely correlated to SOM (correlated to factor 3 with -0.84). This relation can be observed in Figure 4.5-A, where the vector of  $\beta$ -glucosidase RSSI is opposite to the vector of SOM. It can also be seen that pH and  $\beta$ -glucosidase RSSI vector are nearly orthogonal, which indicates that the  $\beta$ -glucosidase RSSI scores are nearly independent from pH. These vectors were also nearly orthogonal in the projection variables on factorial plane (1,2) (data not shown). It can be stated that organic matter is the main parameter influencing  $\beta$ -glucosidase stability and, in this case, increases of SOM reduced the enzyme activity stability. The latter confirms the conclusions of the ANOVA analyses (Figure 4.4-A).

As for the PCA based on RSSI protease results, independence from pH is also suggested, as the two variables' vectors are orthogonal in Figure 4.5-B. The three first factors of the PCA for protease RSSI were kept and together explain 93.5% of the variability. Variables projections on the factorial plane (1,2) are presented in Figure 4.5-B. The third factor, explaining 18.2% of the variance, is only significantly correlated with SOM (0.97). It can be noted that the protease RSSI scores show an inverse correlation to SOM with -0.46 (to factor 3). This result suggests that SOM has an influence on protease stability (data not shown). On the other hand, protease stability seems to be affected by the presence of copper: total copper and dissolved copper vectors are nearly opposite to the RSSI protease. Free copper activity also

seems to have an important impact on protease RSSI. Both vectors on the PCA representation are close. This observation is in agreement with literature that states that free copper ions are a reactive and toxic form. However, free copper is not as strongly correlated to protease as TCu and DCu are. This can be explained by the fact that total copper and soluble copper are known to be more insensitive to pH, in contrast to  $\text{Cu}^{2+}$  that shows strong dependence to pH [50]. The correlation between protease activity and copper speciation shows that the presence of copper decreases enzyme stability. These results confirm that a protease RSSI score might be a good candidate for evaluating the health of copper contaminated soils. This possibility, although promising, needs further investigations to evaluate the capacity of protease RSSI to distinguish between different levels of copper in soil.

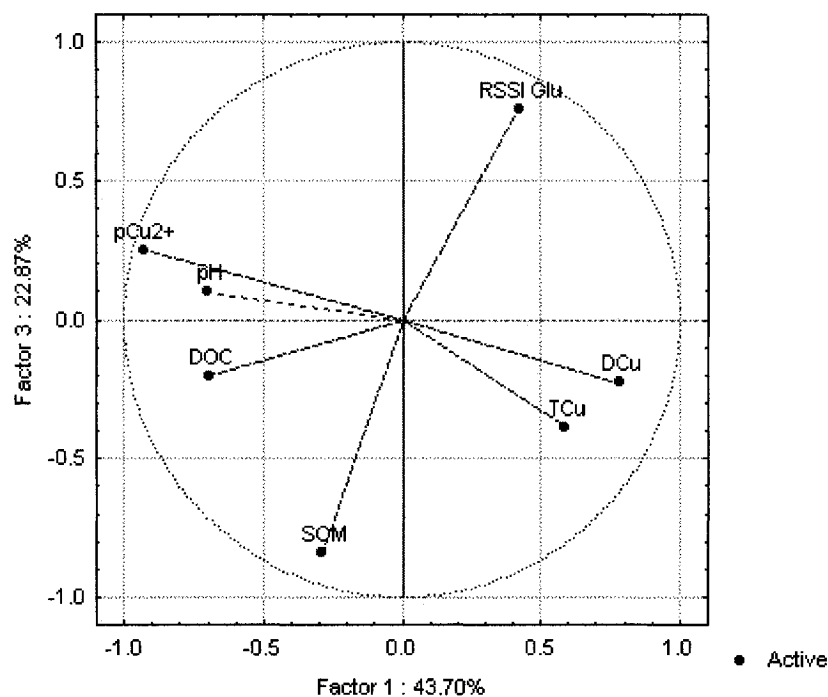


Figure 4.5-A

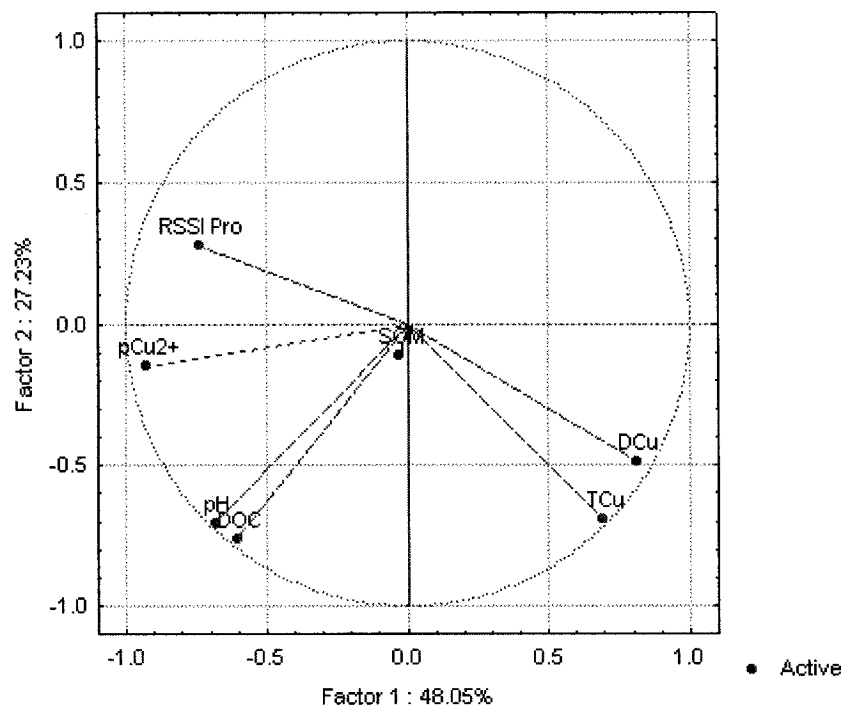


Figure 4.5-B

**Figure 4.5 : Principal Component Analysis (PCA) on RSSI glucosidase (5-A) and RSSI protease (5-B) activities and soil chemical properties. RSSI of protease (RSSI Pro) and RSSI of glucosidase (RSSI Glu) are presented. Copper species are represented by total copper (TCu), dissolved copper (DCu) and  $\text{Cu}^{2+}$  activity (pCu2+). Soil organic matter (SOM), pH and dissolved organic carbone (DOC) are also shown.**

Using the RSSI approach revealed relationships that were not observable because of the strong interference of pH influence on biochemical properties. Moreover, the RSSI is dimensionless, which allows comparison between different soils. Furthermore, the ratio of the enzyme activity in time of a heat perturbed and unperturbed sample of the same soil analysed simultaneously accounts for random variations as well as for chemical

property-induced variations such as pH. This overcomes the major criticism with respect to the lack of “control” encountered when using enzyme activity as an indicator of the impact of pollution [16].

In addition, critical soil RSSI values based on enzyme activity could be developed for assessing different types of pollutants and types of soil management. In the case of protease, the absence of stimulation after the heat perturbation for the contaminated sample suggests the impact on a soil essential process, i.e. nitrogen mineralization cycle, as the natural behaviour of the soil function (stimulation after heat-perturbation) is inhibited. As for the  $\beta$ -glucosidase RSSI scores, the strong and almost exclusive correlation to SOM suggests that this enzyme might be more pertinent for evaluating soil management impacts (e.g. types of amendments, tillage). This is supported by the observations made by Knight and Dick [20] that  $\beta$ -glucosidase activity is sensitive to soil management (e.g. tillage, herbicide or fertilizer use).

#### **4.2.6 Conclusion**

A RSSI-based approach provides valuable information on the soil capacity to perform essential functions with an easy, meaningful and understandable score. In addition, the results strongly suggest that the RSSI helps to take into account variability from random sources and from some chemical properties. Our results suggest that the RSSI scores of both  $\beta$ -glucosidase and protease are independent of soil pH. Therefore, it circumvents the problems related to buffer use in enzyme testing in the presence of metallic pollutants. Finally, it seems to enable comparison with different soils independently of

their intrinsic activity levels. For all these reasons, the use of indices based on functional stability, e.g. RSSI, seems a promising avenue to assess the impact of pollutants and other stress factors on soils.

What is needed now is more work on: the choice of appropriate functions to evaluate RSSI for different soil pollutants; the assessment of the approach to evaluate stability loss from different soil amendments; and determinations of critical RSSI values based on several characteristics (e.g. type of contamination, soil use, etc.). Also, efforts must be made to increase the use of RSSI for enzyme activity assessment of metal-contaminated soils, since using the indices show independence to differences in soil pH. Investigation with different metallic soil pollutants using protease stability and different types of soil management using  $\beta$ -glucosidase stability are examples of interesting avenue for future studies.

#### **4.2.7 Acknowledgements**

The authors wish to thank Bernard Clément, Pierre Legendre and Olivier Gauthier for their assistance in the statistical analysis and Pascal Lesage for the editorial support. The authors acknowledge the financial support of the Chair partners: Alcan, Bell Canada, Cambior, Canadian Pacific Railway, CEAEQ, City of Montréal, Total, Gaz de France/Électricité de France, Hydro-Québec, Ministère de la Métropole du Québec, Petro-Canada and Solvay.

#### 4.2.8 References

1. Doran JW and Parkin TB. 1994. Defining and assessing soil quality. In Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, and Stewart BA, eds, *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp.3-22.
2. Nortcliff S. 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88:161-168.
3. Doran JW and Safley M. 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. In Pankhurst CE, Doube BM, and Gupta VVSR, eds, *Biological Indicators of Soil Health*, Cab International, Oxon, United Kingdom, pp 1-28.
4. Aon MA, Cabello MN, Sarena DE, Colaneri AC, Franco MG, Burgos JL, and Cortassa S. 2001. I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18:239–254.
5. Brookes PC. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 19:269-279.
6. Bååth E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution* 47:335-379.
7. Sauvé S. 2006. Copper inhibition of soil organic matter decomposition in a seventy-year field exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:854-857.

8. Bécaert V and Deschênes L. 2006. Using the concept of soil health to assess ecotoxicological impacts of pollutants on soil microflora. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 188:In press.
9. Struczynski TI, McCarty GW, and Siebiele G. 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead and zinc salt amendments. *Journal of Environmental Quality* 32:1346-1355.
10. Dumestre A, Sauvé S, McBride M, Baveye P, and Berthelin J. 1999. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:124-131.
11. Effron D, de la Horra AM, Defrieri RL, Fontanive V, and Palma RM. 2004. Effect of Cadmium, Copper, and Lead on Different Enzyme Activities in a Native Forest Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35:1309-1321.
12. Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S, and Gil-Sotres F. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1867-1875.
13. Sowerby A, Emmett B, Beier C, Tietema A, Penuelas J, Estiarte M, Van Meeteren MJM, Hughes S, and Freeman C. 2005. Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: interaction with climate change manipulations. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1805-1813.

14. Hinojosa MB, Carreira JA, García-Ruíz R, and Dick RP. 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1559-1568.
15. Bandick KA and Dick RP. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1471-1479.
16. Dick RP. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In Pankhurst CE, Doube BM, and Gupta VVSR, eds, *Biological Indicators of Soil Health*, Cab International, Oxon, United Kingdom, pp 121-156.
17. Allison SD and Vitousek PM. 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology and Biochemistry* 37:937-944.
18. de la Paz Jimenez M, de la Horra AM, Prusso L, and Palma RM. 2002. Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils* 35:302-306.
19. Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Liros MC, and Seoane S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37:877-887.
20. Knight TR, Dick, R.P. 2004. Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* 36:2089-2096.
21. de la Horra AM, Conti ME, and RM. 2003.  $\beta$ -glucosidase and proteases activities as affected by long-term management practices in a typic argiudoll soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 34:2395-2404.



22. McGrath SP. 2002. Bioavailability of metals to soil microbes. In Allen HE, ed, Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants, SETAC Press, U.S., pp 69-87.
23. Geiger G, Furrer G, Funk F, Brandl H, and Schulin R. 1999. Heavy metal effects on  $\beta$ -glucosidase activity influenced by pH and buffer systems. *Journal of Enzyme Inhibition* 14:365-379.
24. Sauvé S. 2002. Speciation of metals in soils. In Allen HE, eds, Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants, SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, pp 7-37.
25. Tabatabai MA. 1994. Soil Enzymes. In Weaver RW, Angle JS, and Bottomley PS, eds, *Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*, 5. SSSA, Winsconsin, pp 775-833.
26. Martínez CE, Jacobson AR, and McBride MB. 2003. Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. *Environmental Pollution* 122:135-143.
27. Pimm SL. 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature* 307:321-326.
28. Karlen DL, Mausbach MJ, Doran JW, Cline RG, Harris RF, and Schuman GE. 1997. Soil quality : A concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial). *Soil Science Society of America Journal* 61:4-10.

29. Orwin KH and Wardle DA. 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1907-1912.
30. Bécaert V, Samson R, and Deschênes L. 2006. Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the Relative Soil Stability Index (RSSI). *Chemosphere* In Press.
31. Muller AK, Westergaard K, Christensen S, and Sørensen SJ. 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology* 44:49-58.
32. Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, and Duncan LC. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* 33:1143-1153.
33. Griffiths BS, Bonkowski M, Roy J, and Ritz K. 2001. Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16:49-61.
34. LECO. 1996. CNS-2000 Elemental analyzer- Instruction manual. St-Joseph, MI USA.
35. Parent LE and Caron J. 1993. Analysis of organic soils. In Carter RM, eds, *Soil Sampling and Methods of Analysis*, Lewis publishers, Boca Raton, Florida, pp 450-452.
36. ASTM. 1989. Standard test method for pH in soil. Designation D 4972. Philadelphia, Pa USA.

37. Anonymous. 1998. 3120B Metals by plasma emission spectroscopy: inductively coupled plasma (ICP) method. In Clesceri LS, Greenberg AE, and Eaton AD, eds, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Baltimore, Maryland, USA, pp 3-38-3-39.
38. Gouvernement du Québec. 1999. *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés*. Les publications du Québec, Quebec, Quebec, Canada.
39. McLaughlin MJ, Hamon RE, Parker DR, Pierzymski GM, Smolders E, Thornton I, and Welp G. 2002. Soil Chemistry. In Fairbrother A, Glazebrook PW, van Straalen NM, and Tarazona JV, eds, *Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils*, SETAC Press, Pensacola, Fl, USA, pp 5-16.
40. Bécaert V. 2004. Évaluation de la stabilité fonctionnelle d'un sol dans un contexte d'étude de la santé du sol. PhD Thesis. École Polytechnique de Montréal, Montreal.
41. Eivazi F and Tabatabai MA. 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 22:891-897.
42. Ladd JN and Butler JHA. 1972. Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptides derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 4:19-39.

43. Sauvé S, McBride MB, and Hendershot W. 1995. Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29:373-379.
44. Sauvé S, Hendershot W, and Allen HE. 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology* 30:1125-1130.
45. McBride M, Sauvé S, and Hendershot W. 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science* 48:337-346.
46. Wuertz S and Mergeay M. 1997. The impact of heavy metals on soil microbial communities. In Jan Dirk van Elsas JTT, Elizabeth M.H. Wellington, eds, *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 683.
47. Mesquita ME and Carranca C. 2005. Effects of dissolved organic matter on copper-zinc competitive adsorption by a sandy soil at different pH values. *Environmental Technology* 26:1065-1072.
48. Smolders E, Brans K, Coppens F, and Merckx R. 2001. Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:2469-2474.
49. Six J, Bossuyt H, Bdegyze S, and Denef K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research* 79:7-31.

50. Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, and Hendershot WH. 1997. Copper solubility and speciation of in-situ contaminated soil: effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air and Soil Pollution* 100:133-149.

## Chapitre 5 Résultats complémentaires

Ce chapitre comporte des résultats complémentaires n'ayant pas été présentés dans le chapitre 4. Étant donnés les problèmes de normalité et d'homogénéité de la variance rencontrés pour les résultats d'activité enzymatique obtenus pour les échantillons contaminés par 750 mg de Cu/kg de sol sec, il a été impossible d'analyser statistiquement ces résultats. Ils ont donc été retirés de l'étude présentée au chapitre 4. De plus, l'évaluation de l'arylsulfatase a été effectuée seulement pour les séries *Ln*, *Ma*, *Mn* et *Hn*. L'analyse de cette enzyme a ensuite été abandonnée car les résultats étaient trop proches de la limite de détection pour pouvoir conclure quoi que ce soit (voir chapitre 6 pour plus de détails).

Il est à noter que les données recueillies expérimentalement sur les propriétés chimiques, présentées ici, ont été utilisées dans des analyses de composantes principales (chapitre 4) afin d'approfondir les relations entre les réponses enzymatiques (courbes et RSSI) et les propriétés chimiques mesurées. La perturbation appliquée sur la moitié des échantillons consiste en un séchage (17h, 60°C). Le changement physique du sol résultant risquant de modifier d'autres propriétés du sol (e.g. propriétés chimiques), les effets de la perturbation sur les propriétés chimiques mesurées ( $pCu^{2+}$ , Cu soluble et COD) ont été représentés graphiquement (section 5.2 à 5.5). Étant donnée qu'aucune analyse statistique n'a été effectuée sur les résultats présentés graphiquement dans le présent chapitre les mesures des échantillons contenant 750 mg/kg de Cu sont montrés. La section 5.1 présente les propriétés physico-chimiques du sol de base auxquels des

amendements ont été faits (voir chapitre 3 pour le type de modifications effectuées) ainsi que les propriétés chimiques des sols après les traitements.

## 5.1 Propriétés des sols

Les propriétés physico-chimiques du sol de base utilisé pour préparer les différents sols du design expérimental choisi sont représentées au tableau 5.1.

**Tableau 5.1 : Propriétés physico-chimiques du sol de base**

Type (USDA)	CRC (g eau/g sol sec)	pH	Contenu en MO (g MO/kg sol sec)	Contenu en N Kjeldhal (mg/kg)	Concentration de Cu Total (mg/kg)
Sable	0,37±0,2	5,6±0,1	27,0±0,1	1200±60	5±0

Comme il en a été fait mention au chapitre 3, des traitements ont été effectués au sol de base afin d'obtenir 18 échantillons de sols. Les 18 échantillons sont regroupés en trois groupes (3 niveaux de cuivre par groupe), dont l'identification est présentée à la figure 3.1. Certaines propriétés des sols suite aux traitements ont été mesurées et sont présentées au tableau 5.2.

**Tableau 5.2 : Propriétés chimiques des sols après les traitements**

Sol	Cu Total		Contenu en		Cu soluble (mg/L)	pCu <sup>2+</sup>
	(mg Cu/kg sol sec)	pH	MO (g <sub>MO</sub> /kg <sub>sol sec</sub> )	COD (mg/L)		
	4±0,2	5,527±0,005	27,0±0,1	8,3±0,7	0,0013±0,0007	8,06±0,05
La	220±15	5,540±0,009	27,0±0,1	11,4±0,8	0,242±0,003	6,58±0,02
	650±45	5,00±0,05	27,0±0,1	8,8±0,9	5,37±0,03	5,67±0,02
	4±0,2	7,79±0,01	27,0±0,1	21±1	0,0032±0,0005	9,06±0,02
Ln	220±15	7,78±0,03	27,0±0,1	21,7±0,3	0,112±0,003	8,49±0,04
	730±51	7,70±0,05	27,0±0,1	23±2	0,24±0,02	7,94±0,03
	3±0,2	5,173±0,005	57,4±0,3	9,1±0,2	0,0007±0,0002	7,75±0,03
Ma	220±15	5,09±0,01	57,4±0,3	11,8±0,9	0,203±0,002	6,184±0,005
	610±42	4,8±0,2	57,4±0,3	10,7±0,2	1,50±0,03	5,473±0,007
	4±0,2	7,76±0,03	57,4±0,3	20,92±5	0,004±0,002	8,953±0,004
Mn	230±16	7,76±0,02	57,4±0,3	19±2	0,124±0,003	8,56±0,03
	740±52	7,75±0,02	57,4±0,3	20±2	0,27±0,02	8,06±0,01

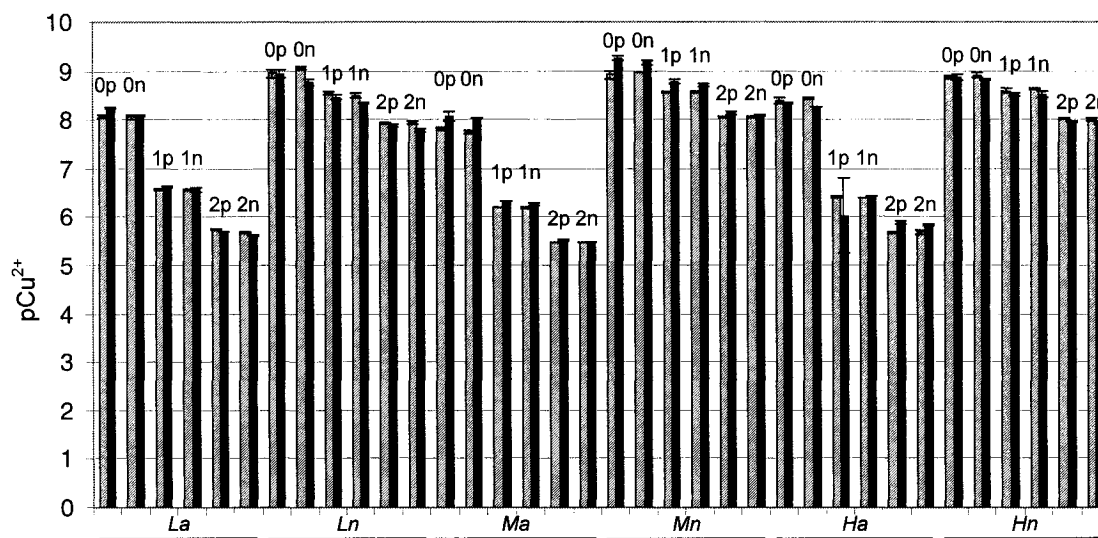


**Tableau 5.2 : Propriétés chimiques des sols suite aux traitements (suite)**

Sol	Cu Total		Contenu en		COD (mg/L)	Cu soluble (mg/L)	pCu <sup>2+</sup>
	(mg Cu/kg sol sec)	pH	MO (g <sub>MO</sub> /kg <sub>sol sec</sub> )				
	4±0,2	4,94±0,02	77,9±0,3		8,2±0,2	0,002±0,003	8,43±0,01
Ha	230±16	4,907±0,005	77,9±0,3		11,4±0,6	0,154±0,002	6,387±0,006
	620±43	4,81±0,02	77,9±0,3		10,3±0,5	0,78±0,08	5,69±0,05
	5,8±0,4	7,817±0,005	7,79±0,3		25±2	0,0052±0,0007	8,90±0,05
Hn	220±15	7,81±0,03	77,9±0,3		25±2	0,107±0,004	8,62±0,01
	690±48	7,730±0,009	77,9±0,3		22,3±0,4	0,23±0,01	8,00±0,04

## 5.2 Effet de la perturbation sur l'activité de l'ion libre du cuivre

Il est reconnu que l'ion libre de cuivre est l'espèce du cuivre contribuant le plus à l'effet toxique et écotoxique de ce contaminant dans les sols contaminés (McGrath, 2002). Un changement de pCu<sup>2+</sup> dans la solution de sol suite à une perturbation occasionnerait des changements de la toxicité aux microorganismes du sol et des mécanismes d'inhibition de l'activité enzymatique. L'effet de la perturbation thermique sur l'activité du cuivre libre est représenté à la figure 5.1.



**Figure 5.1 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur l'activité du cuivre libre. Les bandes hachurées représentent l'activité, exprimée en  $pCu^{2+}$ , mesurée avant la perturbation, et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : L=27 g MO/kg sol , M=57 g MO/kg sol sec, H=78 g MO/kg sol sec; pH : a=acide, n=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats.**

Pour tous les échantillons contaminés, aucun effet significatif de la perturbation sur l'activité du cuivre n'a été détecté. La perturbation a toutefois légèrement affecté l'échantillon non-contaminé du sol *La*. En effet, une augmentation légère, mais

significative, du  $pCu^{2+}$  a été détectée entre les mesures réalisées avant et après la perturbation, soit respectivement  $8,07 \pm 0,02$  et  $8,23 \pm 0,02$ , tandis que l'activité de l'échantillon associé non-perturbé est restée pratiquement constante (avant la perturbation =  $8,06 \pm 0,05$ , après la perturbation =  $8,10 \pm 0,02$ ). Bien que statistiquement valable, cette observation n'est probablement pas associée à une réelle diminution de l'activité du cuivre liée à la perturbation. En effet, l'échantillon en question n'est pas contaminé et ne possède que 4 mg de Cu total/kg de sol sec. Toutefois, il est possible qu'une proportion de la concentration de cuivre dans ce sol était sous la forme  $Cu^{2+}$  avant la perturbation et que celle-ci ait diminué l'activité du cuivre. Il est probable aussi que la perturbation ait relargué en solution d'autres substances, qui ont pu interférer avec l'électrode de cuivre lors de la mesure. De plus, ce changement peut faire partie de l'amplitude normale de variation de l'activité possible dans le temps. Par exemple, l'échantillon *Ma-0n* (0= non contaminé et n=non-perturbé) montre une différence significative, d'une importance comparable à celle observée pour *La-0p* (0= non contaminé et p=perturbé), entre les deux mesures prises à 5 jours d'intervalle, bien qu'aucune perturbation n'ait été appliquée à l'échantillon. Cette dernière hypothèse peut être appuyée par le fait que l'activité du cuivre libre n'est valide que pour les conditions de la solution de sol au moment de la mesure, car celle-ci peut varier en fonction de n'importe quel changement pouvant avoir lieu dans la chimie de la solution de sol, e.g. un changement de le pH de la solution de sol (Sauvé *et al.*, 1995).

Globalement, pour chaque traitement de sol, les échantillons montrent une activité croissante du cuivre libre ( $pCu^{2+}$  décroissant) en fonction de la concentration de cuivre

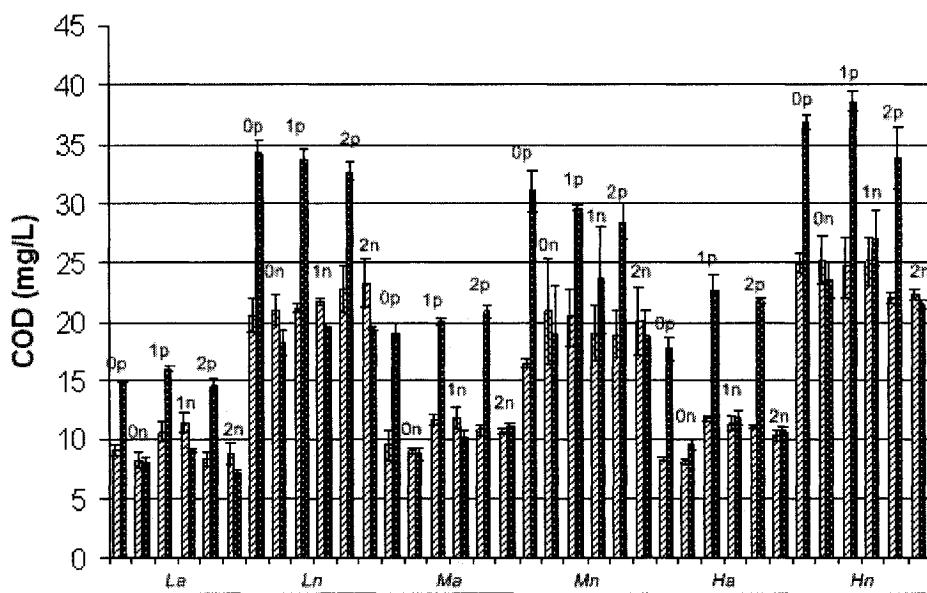
total, ce qui était prévisible. Par contre, une différence entre les activités mesurées dans les échantillons acides et neutres est observable à la figure 5.1. Bien qu'il soit normal que les échantillons neutres présentent une plus faible activité du cuivre due à l'augmentation de l'adsorption du cuivre (Mesquita *et al.*, 2004; Sauvé *et al.*, 1997), cette différence est très marquée et ce même dans les sols non-contaminés. Par exemple, la différence entre *La*-0n et *Lb*-0n, avant la perturbation, est de 1 unité de  $\text{pCu}^{2+}$ , soit respectivement  $8,06 \pm 0,05$  et  $9,06 \pm 0,02$ . Cette différence peut s'expliquer par l'augmentation de la concentration d'acides humiques dans la solution des sol des échantillons ayant un pH neutre. Il a été rapporté que la performance de l'électrode sélective de cuivre (ISE) est affectée par la présence d'acides fulviques (AF) et d'acides humiques (AH) (voir e.g. Yin *et al.*, 2002). De plus, la concentration de carbone organique dissous dans la solution de sol est plus importante dans les sols neutres (voir figure 5.2). Vu que les AH sont solubles à un pH plus alcalin, il est possible que la différence de l'activité de l'ion libre du cuivre observée entre les deux pH des sols s'explique, en partie, par une influence des AH sur l'ISE. Toutefois, aucun changement significatif de  $\text{pCu}^{2+}$  suite à la perturbation n'a été observé malgré une augmentation de la concentration du COD suite à la perturbation thermique (voir figure 5.2). Ceci pourrait signifier que les AH influenceraient seulement l'ISE et non le  $\text{pCu}^{2+}$  dans la solution de sol. Il a, en effet, été rapporté que le  $\text{pCu}^{2+}$  n'est pas affecté par la concentration en matière organique dissoute dans la solution de sol (Alexander *et al.*, 2006). Toutefois, les concentrations en AH et AF des extraits non pas été mesurées, ainsi il est impossible d'établir une hypothèse précise expliquant les résultats obtenus.

### 5.3 Effet de la perturbation sur la concentration en carbone organique dissous

Le carbone organique dissous est une mesure de la quantité de matière organique qui est dissoute dans la solution de sol. Celle-ci est une partie de la matière organique totale du sol. La figure 5.2 représente la concentration de carbone organique dissous mesuré sur les échantillons contaminés et non-contaminés, avant et après la perturbation thermique.

L'observation la plus marquante qui ressort de la figure 5.2 est l'influence évidente et importante de la perturbation thermique sur la dissolution de la matière organique. En effet, tous les échantillons perturbés montrent une augmentation de la concentration du COD suite à la perturbation thermique. L'augmentation la plus marquée de la concentration en COD suite à la perturbation thermique a été observée pour l'échantillon *Mn-0p* passant de  $16,5 \pm 0,4$  mg/L à  $31 \pm 2$  mg/L. Celle-ci peut être expliquée par une accumulation de débris provenant des organismes du sol ayant été détruits par la perturbation thermique ce qui résulte souvent en une stimulation de l'activité microbienne une fois que le sol est réhumidifié, car la matière organique provenant des débris est facilement dégradable (Marschner et Karsten, 2002). À cet égard, Bécaert *et al.* (2006), ont observé, à l'aide de comptes microbiens, une diminution de 1 log de la densité des cellules vivantes suite à une perturbation thermique (60°C, 24 h). Ce phénomène pourrait expliquer la stimulation de l'activité de la protéase suivant la perturbation qui a été observée au chapitre 4 (figure 4.3-D). Ainsi,

la protéase sécrétée en grande quantité permet de fournir des acides aminés pour remplacer les enzymes détruites par la perturbation thermique.

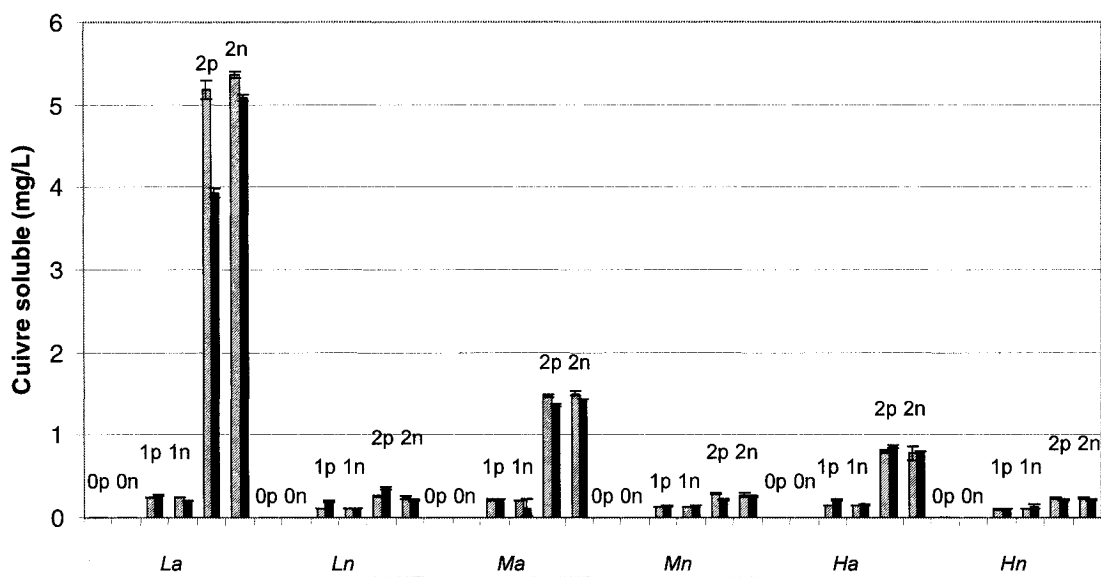


**Figure 5.2 : Effet de la perturbation thermique sur le carbone organique dissous (COD).** Les bandes hachurées représentent la concentration en COD des extraits aqueux des sols, exprimée en mg/L, mesurée avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : L=27 g MO/kg sol sec, M=57 g MO/kg sol sec, H=78 g MO/kg sol sec; pH : a=acide, n=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats.

Selon les résultats obtenus, le contenu en matière organique total du sol semble influencer faiblement la concentration en COD. En effet, en observant la figure 5.2, il est notable que le pH influence plus fortement la dissolution de la matière organique dans la solution de sol que le contenu en matière organique total. Cette observation a été bien représentée à travers les analyses PCA au chapitre 4 et est en accord avec la littérature (Sauvé *et al.*, 1997). En effet, à un pH plus acide la solubilité de la matière organique dissoute est généralement plus faible et elle est constituée de molécules plus dense qu'à pH plus élevé (voir Marschner et Karsten, 2002 pour une revue). Cette relation entre le pH et le contenu en COD expliquerait pourquoi les résultats montrent que le Cu soluble semble être influencé par le pH, bien que la littérature rapporte le contraire. Ainsi, le pH influencerait la concentration en COD qui, elle, aurait un effet sur la solubilité du cuivre. Il a, en effet, été rapporté que le cuivre possède une grande affinité pour la MO. Sauvé *et al.* (1997) ont observé que dans la plupart des sols étudiés 98% du cuivre en solution était complexé à la MO.

#### **5.4 Effet de la perturbation thermique sur le cuivre soluble**

La concentration de cuivre soluble dans la solution de sol comprend le cuivre en solution sous plusieurs formes, entres autres : le cuivre libre et le cuivre complexé à la matière organique dissoute. La figure 5.3 représente la concentration de cuivre soluble en solution avant et après la perturbation thermique pour les échantillons contaminés et non-contaminés.



**Figure 5.3 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur la concentration du cuivre soluble. Les bandes hachurées représentent la concentration en cuivre soluble des extractions à l'eau des sols, exprimé en mg/L, mesurée avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : : *L*=27 g MO/kg sol sec , *M*=57 g MO/kg sol sec, *H*=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats.**

L'effet de la perturbation sur la dissolution du cuivre n'est pas évident. Certains échantillons ont montré une différence significative entre le cuivre soluble mesuré avant



et après la perturbation ainsi qu'en comparaison avec l'échantillon non-perturbé correspondant. Parmi ceux-ci, certains échantillons démontrent une augmentation de la concentration de cuivre en solution suite à la perturbation thermique (*La*-1p, *Ln*-1p et 2p, *Ha*-1p et 2p), tandis que d'autres semblent affectés négativement par la perturbation (*La*-2p, *Ma*-2p, *Mn*-2p). Dans tous les cas, l'influence sur la concentration de cuivre soluble par la perturbation est assez faible en comparaison avec la concentration de cuivre soluble des contrôles, à l'exception de l'échantillon *La*-2p. En effet, la perturbation thermique affecte négativement et distinctement la concentration du cuivre solubilisé dans la solution de sol, passant de  $5,2 \pm 0,1$  mg de Cu/L avant la perturbation à  $3,94 \pm 0,06$  mg de Cu/L après la perturbation. De plus, les échantillons associés au traitement de sol *La*, contaminés à 750 mg de Cu/kg, démontrent la plus forte concentration de cuivre en solution (entre  $3,94 \pm 0,06$  mg de Cu/L et  $5,37 \pm 0,03$  mg de Cu/L). Les concentrations de cuivre soluble mesurées pour les autres traitements de sols ne dépassaient pas  $1,50 \pm 0,03$  mg de Cu/L (*Ma*-2n 5 jours après la perturbation).

Le pH semble aussi avoir un effet sur la concentration de Cu soluble. Notamment, la concentration du cuivre soluble est plus importante dans les sols acides (*a*) que neutres (*n*). Toutefois, l'augmentation du Cu soluble pourrait être attribuée d'autres facteurs que le pH. La littérature rapporte, effectivement, que le Cu soluble est pratiquement insensible au pH et plutôt fortement corrélé à la concentration du cuivre total dans les sols (Sauvé *et al.*, 1997) et à la partition de la matière organique entre la phase solide et la solution de sol (Yin *et al.*, 2002).

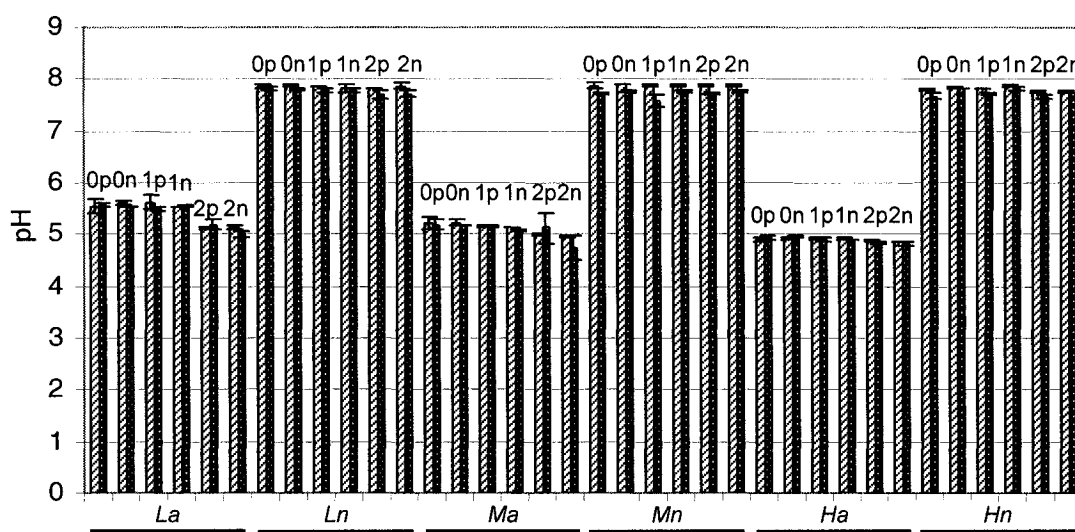
Une autre question peut alors être soulevée : pourquoi la concentration de cuivre soluble n'augmente-t-elle pas systématiquement après l'application de la perturbation thermique (figure 5.3) vu que le contenu en COD augmente suite à la perturbation (figure 5.2) ?

Premièrement, le cuivre est reconnu pour posséder une affinité particulière pour les AH et AF, qui eux, offrent plus de site d'adsorption à pH plus alcalin (Mesquita *et al.*, 2004). Deuxièmement, il a été suggéré dans cette section que l'augmentation de la concentration du COD était probablement due à l'accumulation de matière organique simple provenant des organismes détruits par la perturbation. Ainsi, le cuivre aurait une forte affinité pour les acides humiques et fluviques, mais une faible tendance à se complexer à de la matière organique de structure plus simple. Cette théorie concorde avec les observations de Martínez *et al.* (2003), qui attribuent un changement dans la solubilité du Cu à un changement dans la proportion de la taille des molécules du COD en solution.

## **5.5 Effet de la perturbation thermique sur le pH**

Le pH est une propriété très importante dans les sols. Vu son influence sur les autres propriétés du sol, particulièrement sur l'activité enzymatique, cette propriété a été mesurée avant et après la perturbation pour tous les échantillons. Les résultats de ce suivi sont présentés à la figure 5.4. Globalement, cette figure montre que le pH est pratiquement constant dans le temps autant pour les échantillons perturbés que non-

perturbés. Ainsi, le pH n'a pas d'influence sur les tendances observées dans les sections 5.2 à 5.4 et n'interfère pas avec les hypothèses avancées dans ces sections.



**Figure 5.4 : Effet de la perturbation thermique (17h, 60°C) sur le pH. Les bandes hachurées représentent le pH des extractions à l'eau des sols mesuré avant la perturbation et les bandes noires pointillées blanches représentent les mesures prises 5 jours après la perturbation. Les types de sols sont représentés par *La*, *Ln*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hn* (M.O. : : *L*=27 g MO/kg sol sec , *M*=57 g MO/kg sol sec, *H*=78 g MO/kg sol sec; pH : *a*=acide, *n*=neutre). Les concentrations en cuivre total sont notées au-dessus des bandes (0 = 0 mg/kg, 1 = 250 mg/kg, 2 = 750 mg/kg). Les échantillons ayant subi une perturbation et n'ayant pas subi de perturbation sont différenciés respectivement par p et n au-dessus des bandes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type sur 3 réplicats.**

## Chapitre 6      Discussion générale

L'urgence de développer un indicateur intégrateur et sensible de la santé des sols a souvent été évoquée dans la littérature. Une revue de la littérature a permis de définir les besoins à ce niveau et de mettre en lumière les difficultés à évaluer l'impact d'une contamination métallique sur la santé des sols. Les propriétés biochimiques (e.g. l'activité enzymatique) des sols, reliées aux cycles des nutriments et donc à la survie de la majorité des espèces terrestres, ont souvent été pressenties comme des indicateurs adéquats pour l'évaluation de la santé des sols. Toutefois, certains auteurs ont remarqué que l'évaluation individuelle de l'activité enzymatique semble présenter des limites en tant qu'indicateur de la santé des sols (Gil-Sotres *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2000). Par ailleurs, certains auteurs concluent que l'évaluation individuelle de l'activité enzymatique d'un sol n'apporte aucune information sur sa santé et sa capacité à maintenir ses fonctions (Bécaert *et al.*, 2006). Gil-Sotres (2005), pour sa part, remet en doute la capacité des indices simples basés sur les propriétés biochimiques des sols à évaluer la santé des sols et ce pour différentes raisons dont, notamment, les différences de protocoles de mesure de l'activité enzymatique, d'échantillonnage, d'entreposage et de prétraitement utilisés dans les différentes études. Ainsi, il rappelle que le grand degré de variabilité entre les propriétés biochimiques, à la fois causé par les saisons et les facteurs édaphiques, doit être pris en considération. De plus, les études portant sur les indices biologiques ou biochimiques omettent trop souvent de rapporter les propriétés physico-chimiques des sols (Wuertz et Mergeay, 1997).

## 6.1 Discussion des résultats

### 6.1.1 Les propriétés chimiques

Les résultats présentés aux chapitres 4 et 5 confirment l'effet dominant du pH sur les relations édaphiques des sols. En effet, la concentration de COD, de Cu soluble ainsi que l'activité du cuivre libre se sont toutes montrées influencées par le pH. Entre autres, les valeurs du  $pCu^{2+}$  étaient plus élevées dans les sols neutres, montrant ainsi une activité plus faible. Cette tendance est en accord avec la littérature, car l'adsorption de Cu augmente avec le pH (Mesquita *et al.*, 2004; Sauvé *et al.*, 1997). Toutefois, cette différence est très marquée, et ce, même pour les sols non-contaminés. Par exemple, la différence entre *La-0n* et *Lb-0n*, avant la perturbation, est de 1 unité, soit respectivement  $8,06 \pm 0,05$  et  $9,06 \pm 0,02$ . Le pH exerce une forte influence sur la partition de la MO entre la solution de sol et la phase solide. Par ailleurs, la concentration de COD observée est aussi plus grande dans les sols neutres que dans les sols acides, à tel point que la concentration en COD semble davantage contrôlé par le pH de la solution de sol que par la quantité totale de matière organique des sols (figure 5.2). Cette relation entre le pH et la matière organique empêche parfois de détecter l'influence du COD sur d'autres propriétés chimiques. Par exemple, Sauvé *et al.* (1997) a tenté de déterminer les facteurs influençant la solubilité et la spéciation du cuivre à l'aide de régressions multiples sur une soixantaine de sols différents. L'auteur conclut que la MO n'a pas été détectée comme un paramètre important du sol pour la prédiction de l'activité du cuivre principalement parce que cette relation était masquée par la corrélation entre le pH et

l'activité du cuivre. Dans ce projet, l'interaction entre la concentration en COD et le cuivre soluble est particulièrement difficile à observer, ce qui s'explique probablement par la forte influence du pH sur le COD. Yin (2002) met en évidence l'augmentation du cuivre soluble lors de l'augmentation du contenu du COD en mesurant ces deux propriétés à partir des filtrats de la solution de sol produits en utilisant deux filtres de différentes grosseurs (0,45µm et 0,22 µm). À partir des résultats obtenus, il conclut que le Cu soluble dépend fortement de la distribution entre les phases solide et liquide de la matière organique du sol. Ainsi, la difficulté est d'arriver à découpler l'effet du pH de celui du contenu en COD sur la concentration de cuivre soluble.

#### **6.1.2 La perturbation thermique**

L'effet de la perturbation thermique sur les propriétés chimiques des sols a été évalué au chapitre 5. Martinez *et al.* (2003) ont étudié l'impact de la température et du temps sur la concentration en COD et en cuivre soluble. Ils ont remarqué que la concentration COD augmentait de façon uniforme par rapport à la température (10°C, 30°C, 45°C, 70°C et 90°C) et au temps d'incubation (2 jours, 2 semaines et 2 mois). Ceci concorde avec les résultats obtenus au chapitre 5. En effet, pour tous les échantillons la concentration de carbone organique augmentait en solution suite à la perturbation thermique (17h, 60°C). Cette augmentation de la concentration du COD en solution causée par la perturbation thermique est importante (en moyenne  $10,21 \pm 2,70$  mg/L) et a atteint 113% pour l'un des échantillons (*Ha-0p*).

Selon Martinez (2003), la solubilité du cuivre augmente en fonction de la température jusqu'à 70°C, et ce pour tous les temps d'incubation. Au contraire, bien que certaines variations significatives aient été notées, aucune tendance claire n'était observable entre la concentration de cuivre soluble et la perturbation thermique (voir figure 5.3). En effet, la concentration de cuivre soluble de certains échantillons augmente significativement suite à la perturbation, tandis que pour d'autres elle diminue. Ces différences de concentration du cuivre soluble causées par la perturbation sont, toutefois, assez faibles à l'exception de la diminution observée pour l'échantillon *La-2p* (passant de  $5,2 \pm 0,1$  mg de Cu/L à  $3,94 \pm 0,06$  mg de Cu/L).

En considérant, l'effet de la perturbation sur les propriétés chimiques, il est possible d'élaborer des hypothèses qui permettent d'expliquer pourquoi la concentration de Cu soluble n'augmente pas systématiquement après la perturbation, bien que son affinité particulière pour les substances humiques soit bien connue (voir par exemple Sauvé, *et al.*, 1997 et Mesquita, *et al.*, 2004). En effet, l'hypothèse suivante a été énoncée au chapitre 5 : le Cu a une forte affinité uniquement pour la MO complexe et de poids moléculaire élevé, ce qui implique que le cuivre soluble a peu d'affinité pour le type de MO qui est solubilisé suite à la perturbation (e.g. débris cellulaires). Cette hypothèse est soutenue par la littérature. En effet, Martinez *et al.* (2003) ont montré que : (i) la matière organique soluble ayant un haut poids moléculaire augmente avec une augmentation de la température, (ii) la matière organique soluble ayant un faible poids moléculaire diminue avec le temps, (iii) le cuivre possède une affinité particulière pour la matière organique à haut poids moléculaire. Toutefois, cette hypothèse avancée au chapitre 5

reste spéculative étant donnée que dans ce projet de recherche la matière organique dissoute n'a pas été caractérisée.

L'activité du cuivre, pour sa part, ne semble pas être affectée par les changements de la concentration de COD suite à la perturbation. Ceci est en accord avec la littérature. Récemment, il a été rapporté que le  $pCu^{2+}$  était insensible à la concentration de la matière organique dissoute (Alexander *et al.*, 2006). Cependant, les résultats de  $pCu^{2+}$  étaient toujours plus faibles (i.e. activité plus grande) dans les échantillons acides que dans les sols neutres. Cette tendance peut s'expliquer par (i) l'adsorption du Cu sur la matière organique (McBride *et al.*, 1997) et (ii) des interférences avec l'ISE (e.g. Yin *et al.*, 2002). En effet, Mesquita *et al.* (2004) ont noté que l'adsorption du cuivre était plus importante dans les sols légèrement alcalins ( $pH > 7$ ) que dans les sols acides.

### **6.1.3 L'activité enzymatique**

La  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme ayant été la plus utilisée pour évaluer la santé des sols, particulièrement pour des sols ayant subi différentes pratiques (Gil-Sotres, *et al.*, 2005). L'utilisation de cette enzyme pour évaluer l'impact de contaminants métalliques est plus rare. Par contre, Hinojosa *et al.* 2004, ont montré que l'activité de la  $\beta$ -glucosidase était négativement corrélée ( $R^2$  de -0,64 à -0,75) aux concentrations de Cd, Cu et Zn extraits du sol. Les résultats de la présente étude ne montrent aucun effet du cuivre ni sur l'activité de la  $\beta$ -glucosidase, ni sur celle de la protéase lorsqu'elles sont analysées individuellement (sols non-perturbés). Ceci s'explique probablement par l'influence du pH qui doit masquer l'impact du cuivre sur l'activité des enzymes. En effet, les résultats



du PCA de l'activité de la protéase et de la  $\beta$ -glucosidase en relation avec les différentes propriétés chimiques étudiées (section 4.2.5.2) ont montré un effet dominant du pH. Par exemple, le pH est corrélé (-0.95) avec le facteur 1 (qui représente 47% de la variabilité totale), comme le sont le COD (-0.85), le  $pCu^{2+}$  (-0.87), l'activité de la  $\beta$ -glucosidase (0.70) et l'activité de la protéase (-0.84). Ces relations montrent la forte dépendance de plusieurs propriétés du sol par rapport au pH. Dans ce cas, l'influence du pH est telle qu'aucun impact du cuivre sur l'activité enzymatique n'a pu être détecté. Cette constatation est en accord avec les observations de Smolders *et al.* (2001), qui concluent que les résultats de tests de nitrification sur des sols contaminés par des métaux étaient plus influencés par les propriétés du sol, comme le pH, que par la contamination. Hinojosa *et al.* (2003) ont aussi observé une corrélation de ces résultats enzymatiques avec le pH des sols (0.69). Toutefois, ils ont pu détecter un impact des contaminants, probablement grâce à l'utilisation d'un tampon au pH optimal de l'enzyme lors des essais. Cette pratique, bien que courante, engendre de multiples problèmes. Entre autre, un changement de pH du sol, encouru par l'utilisation d'un tampon, peut modifier la spéciation du métal (Sauvé, 2002, Wuertz et Mergeay, 1997) et la concentration de COD (Mesquita et Carranca, 2005). De plus, le pH optimal de la réaction enzyme substrat peut être décalée par la présence de cuivre (Geiger *et al.*, 1999) en plus de varier spatialement et temporellement dans les sols (Dick, 1997). Allison *et al.* (2005), évaluent l'activité de la  $\beta$ -glucosidase en utilisant une solution tampon ayant le même pH que celui du sol. Toutefois, cette pratique ne permet pas de comparer avec les résultats d'autres études, sans compter que les constituants chimiques des tampons

influencent l'activité de l'enzyme (Geiger *et al.*, 1999). Ces effets engendrés par l'utilisation d'un tampon sont détaillés à la section 2.3.2.2. Bien que ces difficultés aient été évitées par le choix de ne pas utiliser un tampon lors des tests enzymatique, la détection de l'impact du cuivre sur l'activité des enzymes est difficile dû à l'effet du pH.

Au chapitre 4, il a été noté que la  $\beta$ -glucosidase et la protéase n'ont pas répondu de la même façon à l'application de la perturbation thermique (17h, 60°C). L'activité de la  $\beta$ -glucosidase est réduite d'environ 50% suite à la perturbation, pour les sols non-contaminés, et demeure à ce niveau pour toute la période du suivi. Il en va de même pour les sols contaminés pour lesquels l'activité de la  $\beta$ -glucosidase suite à la perturbation thermique est rarement différente de celle du sol non-contaminé correspondant.

Au contraire, la perturbation thermique a stimulé l'activité de la protéase dans le sol non-contaminé dès la deuxième journée après la perturbation. Cette stimulation était particulièrement prononcée dans les sols neutres et a eu lieu entre le premier et le deuxième jour suivant la perturbation thermique. Par exemple, pour le sol *Hb*, l'activité de la protéase de l'échantillon perturbé non-contaminé passe de  $33 \pm 9$   $\mu\text{g}$  de tyrosine/g de sol sec/2h (au jour 1) à  $659 \pm 94$   $\mu\text{g}$  de tyrosine/g de sol sec/2h (au jour 2). Cette activité au jour 2 correspond à une stimulation environ deux fois plus élevée que celle observée pour l'échantillon non-perturbé correspondant. Il est possible d'établir une hypothèse sur le lien entre la stimulation de la protéase et l'augmentation importante de

la concentration en COD suite à la perturbation thermique. En effet, il a été rapporté que le bris du matériel organique sous l'effet de la chaleur résulte souvent en une augmentation de l'activité enzymatique (Marschner et Karsten, 2002). Ainsi, de nouvelles quantités de substances organiques, de structure simple (e.g. matériel cellulaire), se retrouvent solubilisées, qui sont une source facilement assimilable par les microorganismes du sol (voir Marschner et Karsten, 2002 pour une revue sur le sujet). Conséquemment, la stimulation de l'activité de la protéase pourrait être expliquée par la présence de matière facilement assimilable en solution, ce qui engendrerait une production de l'enzyme. Ce scénario est plausible, car les protéases hydrolysent les protéines en solution et les transforment en matériel nécessaire à la récupération de la flore microbienne (e.g. acides aminés) (Dick, 1997).

Toutefois, la stimulation de la protéase n'a pas été observée dans les échantillons contaminés au cuivre. Ainsi l'effet du cuivre sur la protéase est particulièrement évident. Les scores RSSI calculés ont permis de quantifier les observations mentionnées ci-dessus tout en donnant aux résultats une signification quant à la capacité du sol à effectuer une fonction suite à un stress thermique (voir chapitre 4). Le RSSI permet d'évaluer le sol comme un tout. C'est un indice relatif ce qui rend cette approche particulièrement intéressante, car le résultat est fonction de l'activité intrinsèque du sol.

Pour la  $\beta$ -glucosidase, l'ANOVA des scores RSSI n'a pas montré de différence significative entre la présence et l'absence de cuivre pour tous les échantillons. Par contre, l'ANOVA des scores RSSI de la protéase a permis de détecter une différence

significative pour l'ensemble des sols étudiés. L'analyse des relations entre l'activité des enzymes et les propriétés chimiques a été approfondie à l'aide d'une PCA. Un résultat particulièrement intéressant de cette analyse est le fait que le vecteur RSSI est, orthogonal par rapport au vecteur du pH pour les deux plans factoriels (1,2 et 1,3) de la  $\beta$ -glucosidase. Pour la protéase, le vecteur RSSI est aussi orthogonal au vecteur du pH pour le plan factoriel 1,2, mais ces vecteurs sont très proches dans le plan factoriel 1,3 (annexe 2). Ceci indique qu'il y a une indépendance partielle du pH au RSSI de la protéase. Il faut toutefois faire attention à l'interprétation des PCA. Bien que ces deux vecteurs soient proches dans le plan 1,3, ils sont assez éloignés lorsque les deux plans factoriels sont considérés ensembles. Les données du tableau A2-7 permettent de mieux interpréter la relation qui existe entre le pH et le RSSI de la protéase. Ceci indique que le RSSI est pratiquement indépendant du pH. Toutefois, il est notable que les résultats de l'ANOVA du RSSI de la protéase montre une différence entre les sols acides et les sols neutre. Cette observation n'implique pas nécessairement que le pH influence grandement le RSSI de la protéase, car l'ANOVA indique seulement si les traitements ont un effet significatif sur le RSSI. Bien que l'influence du pH sur le RSSI de la protéase ne soit pas totalement clair, les résultats permettent de faire l'hypothèse que d'autres propriétés chimiques, qui elles sont dépendante du pH, aient une plus grande influence sur le RSSI de la protéase. Ainsi, l'approche proposée a permis de faire, en partie, fi du pH. Une indépendance des scores RSSI au pH pourrait permettre de comparer les résultats provenant de différentes études effectuées sur des sols ayant des caractéristiques différentes. En plus, cette indépendance permettrait d'observer des

corrélations qui, autrement, pourraient être masquées par l'effet prépondérant du pH. Par exemple, sans l'utilisation du RSSI, les résultats du PCA montrent que l'activité de la  $\beta$ -glucosidase, ne se corrèle à la MO qu'avec -0.56 par rapport au facteur 3. Au contraire, les vecteurs du RSSI de la  $\beta$ -glucosidase et de la MO sont en opposition, donc qu'il y a une corrélation négative entre ces variables.

Ainsi, le RSSI de la  $\beta$ -glucosidase semble être sensible à la stabilité du sol en fonction des différents traitements d'amendement en MO. Le RSSI de la protéase, pour sa part, montre que la protéase est corrélée négativement à la présence des espèces du cuivre. En effet, le vecteur de la protéase est en opposition avec les vecteurs du cuivre total et du cuivre soluble et en corrélation avec le vecteur du  $\text{pCu}^{2+}$ .

Finalement, bien que la protéase soit une enzyme très peu utilisée comme indicateur de la santé des sols, Effron (2004) rapporte que l'activité de cette enzyme a montré la plus grande sensibilité à une contamination aux Cd, Cu et Pb pour tous les temps d'incubation étudiés. Il en conclut que la protéase est l'enzyme la plus prometteuse en tant qu'indicateur pour la pollution par le Cu, le Cd et le Pb. Pour ce qui est de la  $\beta$ -glucosidase, il n'y a pas de consensus dans la littérature quant à la sensibilité de l'enzyme envers une contamination métallique des sols. Certains auteurs rapportent que la  $\beta$ -glucosidase est un bon indicateur de la pollution métallique (voir par exemple Hinojosa *et al.*, (2004)), tandis que d'autres ont observé une insensibilité de l'enzyme envers ce type de contamination (voir par exemple Effron *et al.* (2004)). Par contre, plusieurs auteurs mentionnent que la  $\beta$ -glucosidase est probablement plus adaptée à

l'évaluation de la santé des sols par rapport aux différents traitements imposés aux terres agricoles (Bandick et Dick, 1999; de la Horra *et al.*, 2003; Knight, 2004). Il est, bien sûr, difficile de comparer les résultats obtenus dans la présente étude avec les résultats cités ci-dessus. En effet, bien que les enzymes étudiées soient les mêmes, l'approche adoptée est différente et l'information qu'apportent les résultats par rapport aux processus des sols est aussi différente. Toutefois, les conclusions de la présente étude sont très similaires aux conclusions rencontrées dans la littérature. Il a en effet été conclu au chapitre 4 que la stabilité fonctionnelle de la protéase semble être un bon indicateur pour la santé des sols contaminés par le cuivre, contrairement à la  $\beta$ -glucosidase qui, par sa forte corrélation à la matière organique du sol, semble plus adaptée dans un contexte d'évaluation de l'impact des traitements des sols en milieu agricole.

## **6.2 Discussion méthodologique**

### **6.2.1 Analyse de l'activité de l'arylsulfatase**

Au commencement de l'étude, une troisième enzyme avait été choisie. En effet, l'arylsulfatase avait été sélectionnée grâce à la sensibilité qu'elle démontre face à la contamination métallique des sols (Dick, 1997; Effron, *et al.*, 2004; Hinojosa, *et al.*, 2004). Par exemple, Effron *et al.* (2004) a noté que l'arylsulfatase présentait le plus grand degré d'inhibition, pour le premier temps d'incubation étudié, par la contamination au Cd, Cu et Pb d'un sol forestier en comparaison aux autres enzymes étudiées ( $\beta$ -glucosidase, phosphatase acide, protéase et uréase). En prenant compte de

tous les résultats de cette étude, l'arylsulfatase est une des enzymes ayant le meilleur potentiel en tant qu'indicateur de la santé des sols. De plus, Dick (1997), souligne que l'arylsulfatase est probablement l'enzyme la plus sensible à la contamination en métaux traces. Toutefois, l'évaluation de l'activité de cette enzyme dans la présente étude a rapidement été abandonnée. Seule les échantillons de la série *Ln*, *Ma*, *Mn* et *Hn* ont été testés à l'aide de l'arylsulfatase. Cette décision a été prise, car l'activité mesurée dans les échantillons autant perturbés que non-perturbés était très faible et même parfois sous la limite de détection. De plus, les erreurs expérimentales étaient très importantes, ainsi très peu d'échantillons ont pu être différenciés significativement des autres (voir Annexe 4). Ces difficultés peuvent être expliquées par 1) la faible activité de l'enzyme dans le sol, 2) la précipitation observée dans certains échantillons et 3) la coloration du substrat non-transformé en solution aqueuse. La première hypothèse fait référence à l'influence négative sur l'activité de l'arylsulfatase qu'aurait pu avoir la structure du sol étudié : un sable limoneux. En effet, Hinojosa (2004) a noté une plus grande inhibition de l'arylsulfatase dans les sols ayant une surface de contact, une CEC et un contenu en matière organique plus faible. La texture sableuse du sol étudié n'offrait effectivement peu de surface de contact. La deuxième hypothèse fait référence à une observation expérimentale. En effet, pour certains échantillons, il était possible d'observer la formation d'un précipité qui aurait potentiellement créé une interférence sur les mesures d'absorbance. La troisième hypothèse est aussi basée sur une observation expérimentale. Il a été constaté que le substrat (potassium-*p*-nitrophenylsulfate) utilisé pour mesurer l'activité de l'arylsulfatase possédait une coloration jaune en milieu

aqueux, augmentant ainsi l'absorption des contrôles. Cette dernière est probablement à l'origine du fait que la limite de détection était plutôt élevée.

### **6.2.2 Échantillons contaminés à 750 mg/kg de Cu**

Les résultats obtenus pour le plus haut niveau de contamination en Cu ont été exclus des analyses statistiques, car ils ne répondaient pas aux postulats de base des tests statistiques utilisés (homogénéité de la variance, normalité des données). De plus, le comportement de l'activité enzymatique à cette concentration de cuivre ne permettait pas de déduire de tendances (Annexe 4). Il a toutefois été noté que dans les échantillons de sols acides, particulièrement pour les sols de type *La* et *Ma*, l'activité à 750 mg de Cu/kg de sol sec était très faible, à la fois pour les échantillons perturbés que les non-perturbés. Par conséquent, les scores RSSI calculés fluctuent de façon importante, l'outil étant trop sensible aux variations de l'activité. En effet, pour l'échantillon *Ma* à 750 mg/kg, les six scores RSSI calculés à partir des réplicats varient de 60,9 à 174,0  $\mu\text{g tyrosine g}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$ . Ainsi, le RSSI devrait être calculé avec des courbes d'activité assez importantes pour éviter ce genre de problèmes. Il existe plusieurs façons de remédier à une réponse de l'activité enzymatique trop faible : 1) augmenter le temps d'incubation tout en ajoutant du toluène pour arrêter la croissance microbienne (Tabatabai, 1994), 2) diminuer la dilution des échantillons et 3) augmenter la masse de sol utilisée pour les tests.

Jusqu'à maintenant, les études faites sur le RSSI sont dites de laboratoire. Toutefois, les tests de laboratoire sont rarement représentatifs de la réalité. Tout spécialement pour les



sols contaminés par des métaux, la contamination en laboratoire par des sels surestime l'impact qu'une contamination âgée peut avoir sur un sol. En effet, sur le terrain, l'augmentation des concentrations en cuivre se fait habituellement sur une longue période de temps et les équilibres entre la spéciation du cuivre et les propriétés du sol ont le temps de se stabiliser. Smolders (2003) compare d'ailleurs la toxicité du zinc sur les processus microbiens (nitrification, respiration et la minéralisation de l'azote) entre un sol contaminé au laboratoire et un sol de contamination âgée (sur le terrain). Il observe que la différence entre les seuils de toxicité du sol, pour les processus étudiés, provenant du terrain et du sol contaminé en laboratoire est évidente et même frappante. Il tente d'expliquer cette différence, entre autres, par la variabilité plus importante qui est présente dans des échantillons prélevés sur le terrain, l'acclimatation des microorganismes et la diminution de la disponibilité de ces métaux aux microorganismes dans les sols à contamination âgée. Dans la présente étude, la contamination au cuivre a été suivie par des cycles mouillage/séchage afin de simuler le vieillissement de la contamination. Par la suite, le sol a été lixivié afin de simuler le lessivage naturel des ions en surplus qui aurait eu lieu sur un sol en place. En effet, Smolders (2003) a noté que la lixiviation d'un sol contaminé diminuait les effets négatif du zinc en comparaison à un sol ayant une concentration équivalente non-lixivié. Ainsi, la lixiviation des sols contaminés en laboratoire est une approche préférable offrant une représentation plus réaliste de la problématique d'un sol contaminé par les métaux sur le terrain (Smit et Van Gestel, 1998). Bien que des précautions particulières aient été

prises au laboratoire afin que les résultats soient le plus représentatif possible de la réalité, des études de terrain permettraient d'établir concrètement les limites du RSSI.

### **6.2.3 Entreposage et incubation**

Mise à part la représentativité des échantillons contaminés par rapport à une contamination réelle sur le terrain, d'autres problèmes d'ordre méthodologique peuvent être soulevés, dont l'entreposage des sols après le traitement et l'incubation des macrocosmes avant la perturbation. Premièrement, l'entreposage des sols après le traitement s'était fait entre 20°C et 25°C dans des pots en HDPE fermés qui étaient aérés une fois semaine pour éviter que les échantillons entrent en anaérobie. Cette méthode n'est pas nécessairement mauvaise. Il est en effet recommandé de conserver les sols à cette température après les traitements de contamination des sols et pendant les tests microbiens en laboratoire (McLaughlin *et al.*, 2002). Par contre, certains auteurs utilisent des méthodes permettant une meilleure aération des sols. Par exemple, une étude utilise des contenants en verre et s'assure d'ajuster la masse d'eau perdue deux fois par semaine à l'aide d'eau déionisée (Lock et Janssen, 2001). De son côté, Hinojosa (2004) utilise des contenants en plastique avec un couvercle perforé de telle sorte que l'échange de gaz est permis en minimisant l'évaporation. Le niveau d'humidité était aussi maintenu par l'ajout d'eau déionisée tous les 2 jours. Ainsi, il aurait peut-être été plus rigoureux d'adopter une méthode d'entreposage des sols similaire à celle proposée dans ces études. Pour le deuxième point, les résultats observés supposent que l'incubation des macrocosmes avant la perturbation aurait pu être

prolongée. Celle-ci était d'une durée de trois jours et avait pour but de stabiliser l'activité enzymatique des échantillons de sol avant d'effectuer les tests. Certains résultats, bien que rares, montraient que l'activité enzymatique des sols n'avait pas eu assez de trois jours pour se stabiliser. Par exemple, pour l'échantillon *Ln*, l'activité de la  $\beta$ -glucosidase au jour 1, pour l'échantillon non-perturbé, est presque identique à celle de l'échantillon perturbé, soit respectivement  $3 \pm 4$  et  $3 \pm 2$   $\mu\text{g p-nitrophénol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Par la suite, l'activité de l'échantillon non-perturbé augmente significativement jusqu'au jour 3, où il atteint  $25 \pm 2$   $\mu\text{g p-nitrophénol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Ces observations semblent montrer que trois jours d'incubation avant les tests ne sont pas suffisants. Dans la littérature, certaines études procèdent à une incubation des sols oscillant entre 6 et 8 jours (e.g. Smolders *et al.*, 2003).

## **Chapitre 7      Conclusions et recommandations**

### **7.1 Conclusions**

En conclusion, le RSSI semble être un outil prometteur : il est simple, intégrateur et a une signification concrète en ce qui concerne la perte de stabilité fonctionnelle des sols. Les scores obtenus à l'aide du RSSI sont sans dimension et mesurent la capacité d'un sol à transformer un substrat suite à une perturbation par rapport à la capacité intrinsèque du même sol lorsqu'il n'est pas perturbé.

Il a été mis en évidence qu'un sol contaminé par 250 mg de Cu/kg de sol sec et un sol non contaminé présentaient des valeurs de RSSI différentes (pour le RSSI de l'activité de la protéase à la suite d'une perturbation thermique) ce qui signifie que cette contamination au cuivre a eu un impact sur la capacité du sol à fonctionner. Par contre, le RSSI basé sur l'activité de la  $\beta$ -glucosidase n'a pas connu de variations significatives reliées à la contamination au cuivre pour tous les échantillons de sol étudiés.

Un résultat important de cette étude est la quasi-indépendance des scores RSSI de l'activité des deux enzymes à l'égard des deux pH étudiés dans les sols. Cette constatation augmente l'intérêt du RSSI, car le pH est l'une des propriétés les plus influentes du sol en ce qui concerne les processus microbiens, ce qui a freiné jusqu'à présent l'utilisation de ces derniers comme indicateurs de la santé des sols. L'influence du pH nuit donc à la comparaison de résultats provenant de sols dont les propriétés chimiques diffèrent et, par conséquent, empêche la comparaison des résultats de différentes études de la littérature. Au contraire, le RSSI a permis d'observer des

relations entre l'activité enzymatique et certaines propriétés des sols en s'affranchissant de l'influence du pH sur les processus microbiens. Entre autre, le contenu en matière organique s'est révélé inversement corrélé avec le RSSI de l'activité des enzymes, particulièrement avec celui de la  $\beta$ -glucosidase. Il a également été possible d'évaluer l'impact d'un stress thermique sur certaines propriétés chimiques des sols. En particulier, la concentration de COD qui a augmenté pour tout les échantillons 5 jours après l'application de la perturbation thermique.

Par ailleurs, le fait de déterminer le RSSI à l'aide d'un ratio entre l'activité enzymatique (suivie dans le temps) des sols perturbés et des sols non-perturbés permet de s'affranchir des variations aléatoire de cette même activité enzymatique au cours du temps.

Finalement, l'objectif de ce projet de maîtrise a été partiellement atteint. En effet, il a été possible de valider l'utilisation du RSSI de l'activité de la protéase dans le contexte de sols faiblement contaminés au cuivre, ainsi que de découpler l'effet du pH des changements engendrés par la présence de cuivre pour cette enzyme. Par contre, le RSSI de la  $\beta$ -glucosidase ne semblait pas sensible à la présence de cuivre. De plus, le rejet des données pour les sols à 750 mg de Cu/kg de sol sec des analyses statistiques a empêché d'évaluer la sensibilité de l'outil à distinguer les différentes concentrations de cuivre dans les sols. Toutefois, les résultats de cette étude ouvrent la porte à des perspectives prometteuses pour le RSSI en ce qui concerne l'évaluation des impacts suite à des pollutions où à d'autres stress sur les sols.

## **7.2 Recommandations et perspectives**

Au cours de ce projet de maîtrise les résultats obtenus et les difficultés rencontrées ont abouti à la formulation de quelques recommandations méthodologiques qui permettront d'améliorer les pratiques de laboratoire. Les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche suggèrent de nouvelles applications pour le RSSI ainsi que des axes d'orientation pour le développement futur de cet outil.

### **7.2.1 Recommandations méthodologiques**

Afin d'améliorer et d'uniformiser les expérimentations sur les sols, les recommandations suivantes doivent être suivies :

- Entreposer les sols dans des contenants en plastique recouverts d'une membrane perforée. Celle-ci a pour objet de favoriser les échanges gazeux tout en limitant l'évaporation. La teneur en eau des sols devra alors être ajustée aux deux jours.
- Augmenter le temps d'incubation des sols à environ 7 jours afin d'augmenter le temps de stabilisation de l'activité enzymatique après l'humidification (60% de la CRC).
- Favoriser la formation d'agrégats car ces derniers ont un rôle essentiel au niveau de la santé et de la stabilité des sols. Par exemple, en ajoutant l'eau par capillarité lors des cycles mouillages-séchages et en conservant des organismes de la macro-faune pour toute la durée du traitement des sols.

- Faire des pré-tests supplémentaires pour déterminer le taux de dilution nécessaire et la masse de sol optimale lors de chacun des traitements du sol afin de s'assurer d'observer des différences significatives d'activité enzymatique entre le sol non-perturbé et le sol perturbé, faute de quoi les scores RSSI resteront difficiles à analyser statistiquement.
- Caractériser le COD des solutions de sol, notamment les teneurs en AH et AF.
- Tester la capacité du RSSI de l'activité de la protéase à distinguer différentes concentrations de cuivre les unes des autres ainsi que sa capacité à détecter l'éventuel impact d'autres métaux sur la santé des sols.
- Évaluer la capacité du RSSI de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase à mesurer la stabilité fonctionnelle des sols suite à divers types de gestion des sols agricoles.
- Évaluer la capacité du RSSI basé sur d'autres fonctions, comme le taux de nitrification potentielle ou la respiration, à détecter divers types de contaminations des sols. Ainsi, une « batterie » de plusieurs RSSI évaluant la stabilité de différentes fonctions du sol pourrait être désignée pour l'évaluation plus générale de la santé des sols.
- Valider l'utilisation du RSSI sur des sols naturels possédant différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques. Étant donné que l'intérêt principal de cet outil réside dans son potentiel d'intégration des caractéristiques des sols (affranchissement de l'influence du pH et des variations aléatoires des caractéristiques du sol dans le temps), il est recommandé de tester ses

performances avec des sols très variés d'origine naturelle. Ce genre d'étude permettrait de s'assurer que le RSSI offre effectivement la possibilité de comparer des résultats provenant d'études différentes

### **7.2.2 Perspectives**

Le RSSI pourrait être utile pour différentes applications :

- En tant qu'indicateur de santé des sols. Le RSSI pourrait ultimement servir e.g. à établir une réglementation plus représentative des dommages au sol en tant qu'écosystème, à adopter des pratiques agricoles durables, etc.
- En tant qu'outil au sein de la communauté scientifique pouvant permettre une comparaison plus fiable entre les résultats de différentes études sur la santé des sols.
- En tant qu'indicateur d'impact en analyse du cycle de vie dans la catégorie d'impact « utilisation du territoire ».



## Références

- ALEXANDER, P. A., THAKALI, S., ALLEN, H. E., DI TORO, D. M., ACKERMAN, A. J. 2006. "Effect of soil properties on copper release in soil solutions at low moisture content". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25:3. 671-682.
- ALLISON, S. D., VITOUSEK, P. M. 2005. "Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs". *Soil Biology and Biochemistry*. 37. 937-944.
- AON, M. A., CABELLO, M. N., SARENA, D. E., COLANERI, A. C., FRANCO, M. G., BURGOS, J. L., CORTASSA, S. 2001. "I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil". *Applied Soil Ecology*. 18. 239-254.
- ANONYME 1998. "3120b metals by plasma emission spectroscopy : Inductively coupled plasma (ICP) method". *Standard methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Baltimore, Maryland, USA, pp 3-38-3-39.
- ASTM 1989. *Standard test method for ph in soil. Designation d 4972*, Philadelphia, Pa., USA.
- BÅÅTH, E. 1989. "Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review)". *Water, Air and Soil Pollution*. 47. 335-379.
- BÅÅTH, E., DÍAZ-RAVÍNA, M. 1998. "Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community". *Applied Environmental Microbiology*. 64. 238-245.

- BALASOIU, F. C., ZAGURY, J. G., DESCHÊNES, L. 2001. "Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition". *The Science of the Total Environment*. 280. 239-255.
- BANDICK, K. A., DICK, R. P. 1999. "Field management effects on soil enzyme activities". *Soil Biology and Biochemistry*. 31. 1471-1479.
- BÉCAERT, V. 2004. *Évaluation de la stabilité fonctionnelle d'un sol dans un contexte d'étude de la santé du sol*. 212p. Thèse de doctorat, Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec.
- BÉCAERT, V., DESCHÊNES, L. 2006. "Using the concept of soil health to assess ecotoxicological impacts of pollutants on soil microflora". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. En impression.
- BÉCAERT, V., SAMSON, R., DESCHÊNES, L. 2006. "Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI)". *Chemosphere*. En impression.
- BROOKES, P. C. 1995. "The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals". *Biology and Fertility of Soils*. 19. 269-279.
- BRUINS, M. R., KAPIL, S., OEHME, F. W. 2000. "Microbial resistance to metals in the environment". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 45. 198-207.
- BRUSSAARD, L. 1997. "Biodiversity and ecosystem functioning in soil". *Ambio*. 26:8. 563-570.

- CLAPP, C. E., HAYES, M. H. B., SIMPSON, A. J., KINGERY, W. L. 2005. "Chemistry of soil organic matter". *Chemical processes in soils*, Soil Society Science of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, 723.
- DE LA HORRA, A. M., CONTI, M. E., PALMA, R. M. 2003. " $\beta$ -glucosidase and proteases as affected by long-term management practices in a typic argiudoll soil". *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 34:17-18. 2395-2404.
- DE LA PAZ JIMENEZ, M., DE LA HORRA, A. M., PRUSSO, L., PALMA, R. M. 2002. "Soil quality: A new index based on microbiological and biochemical parameters". *Biology and Fertility of Soils*. 35. 302-306.
- PEREZ-DE-MORA, A., ORTEGA-CALVO, J. J., CABRERA, F., MADEJON, F. E. 2005. "Changes in enzyme activities and microbial biomass after "in situ" remediation of a heavy metal-contaminated soil". *Applied Soil Ecology*. 28. 125-137.
- DEGENS, B. P., SCHIPPER, L. A., SPARLING, G. P., DUNCAN, L. C. 2001. "Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance?" *Soil Biology and Biochemistry*. 33. 1143-1153.
- DICK, R. P. 1997. "Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health". *Biological indicators of soil health*, Cab International, Oxon, United Kingdom, 121-156.
- DOBRAN, S., ZAGURY, G. J. 2005. "Arsenic speciation and mobilization in CCA-contaminated soils: influence of organic matter content". *Science of the Total Environment*. En impression.

DORAN, J. W. 2002. "Soil health and global sustainability: Translating science into practice". *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 88. 119-127.

DORAN, J. W., PARKIN, T. B. 1994. "Defining and assessing soil quality". *Defining soil quality for a sustainable environment*, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp.3-22.

DORAN, J. W., SAFLEY, M. 1997. "Defining and assessing soil health and sustainable productivity". *Biological indicators of soil health*, Cab International, Oxon, United Kingdom, 1-28.

DORAN, J. W., ZEISS, M. R. 2000. "Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality". *Applied Soil Ecology*. 15. 3-11.

DUMESTRE, A., SAUVÉ, S., MCBRIDE, M., BAVEYE, P., BERTHELIN, J. 1999. "Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 36. 124-131.

EFFRON, D., DE LA HORRA, A. M., DEFRIERI, R. L., FONTANIVE, V., PALMA, R. M. 2004. "Effect of cadmium, copper, and lead on different enzyme activities in a native forest soil". *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 35:9-10. 1309-1321.

EIVAZI, F., TABATABAI, M. A. 1990. "Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils". *Soil Biology and Biochemistry*. 22:7. 891-897.

GEIGER, G., FURRER, G., FUNK, F., BRANDL, H., SCHULIN, R. 1999. "Heavy metal effects on  $\beta$ -glucosidase activity influenced by pH and buffer systems". *Journal of Enzyme Inhibition*. 14. 365-379.

GIL-SOTRES, F., TRASAR-CEPEDA, C., LIROS, M. C., SEOANE, S. 2005. "Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties". *Soil Biology and Biochemistry*. 37. 877-887.

GONG, P., SUN, T.-H., BEUDERT, G., HAHN, H. H. 1997. "Ecological effects of combined organic or inorganic pollution on soil microbial activities". *Water, Air and Soil Pollution*. 96. 133-143.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC 1999. *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés*, Les publications du Québec, Québec, Québec, Canada., 124.

GRIFFITHS, B. S., BONKOWSKI, M., ROY, J., RITZ, K. 2001. "Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soils following environmental impacts". *Applied Soil Ecology*. 16. 49-61.

GRIFFITHS, B. S., RITZ, K., BARDGETT, R. D., COOK, R., CHRISTENSEN, S., EKELOUND, F., SØRENSEN, S. J., BÅÅTH, E., BLOEM, J., RUITER, P. C., DOLFING, J., NICOLARDOT, B. 2000. "Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: An examination of the biodiversity- ecosystem function relationship". *OIKOS*. 90. 279-294.

KRISHNAMURTI, G. S. R., NAIDU, R., 2002. "Solid-solution speciation and phytoavailability of Copper and Zinc in soils". *Environmental Science and Technology*. 36. 2645-2651.

HINOJOSA, M. B., CARREIRA, J. A., GARCÍA-RUIZ, R., DICK, R. P. 2004. "Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils." *Soil Biology and Biochemistry*. 36:10. 1559-1568.

JENNY, H. 1941. *Factors of Soil Formation: A System of Quantitative Pedology*. [En ligne]. McGraw-Hill Book Company, New York, NY, USA, 191. <http://www.soilandhealth.org/01aglibrary/010159.Jenny.pdf> (page consultée le 26 avril 2006)

KARLEN, D. L., MAUSBACH, M. J., DORAN, J. W., CLINE, R. G., HARRIS, R. F., SCHUMAN, G. E. 1997. "Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation (a guest editorial)". *Soil Science Society of America Journal*. 61. 4-10.

KAUFMAN, L. H. 1982. "Stream aufwuchs accumulation: Disturbance frequency and stress resistance and resilience". *Oecologia*. 52. 57-63.

KNIGHT, T. R., DICK, R.P. 2004. "Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality". *Soil Biology and Biochemistry*. 36. 2089-2096.

LADD, J. N., BUTLER, J. H. A. 1972. "Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptides derivatives as substrates". *Soil Biology and Biochemistry*. 4. 19-39.

LECO 1996. *Cns-2000 elemental analyzer- instruction manual*. St-Joseph, MI, USA.

LIESACK, W., JANSSEN, P. H., RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N. L., STRACKENBRANDT, E. 1997. "Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques". *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 683.

LINDEIJER, E. 2000. "Biodiversity and life support impacts of land use in LCA". *Journal of Cleaner Production*. 8. 313-319.

LOCK, K., JANSSEN, C. R. 2003. "Influence of ageing on zinc bioavailability in soils". *Environmental Pollution*. 126. 371-374.

MARSCHNER, B., KARSTEN, K. 2002. "Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved matter in soils". *Geoderma*. 113. 211-235.

MARTÍNEZ, C. E., JACOBSON, A. R., MCBRIDE, M. B. 2003. "Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil". *Environmental Pollution*. 122:1. 135-143.

MCBRIDE, M. B., SAUVÉ, S., HENDERSHOT, W. H. 1997. "Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils". *European Journal of Soil Science*. 48. 337-346.

MCGRATH, S. P. 2002. "Bioavailability of metals to soil microbes". *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*, SETAC Press, U.S.A., 69-87.

MCGRATH, S. P., KNIGHT, B. P., KILLHAM, K., PRESTON, S., PATON, G. I. 1999. "Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18:4. 659.

MCGRATH, S. P., CHECKAI, R. T., SCOTT-FORDSMAND, J. J., GLAZEBROOK, P. W., GRAEME, P. I., VISSER, S. 2002. "Recommendations for testing toxicity to microbes in soil". *Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils*, SETAC Press, Pensacola, Fl, USA, 17-35.

MCLAUGHLIN, M. J., HAMON, R. E., PARKER, D. R., PIERZYMSKI, G. M., SMOLDERS, E., THORNTON, I., WELP, G. 2002. "Soil chemistry". *Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils*, SETAC Press, Pensacola, Fl, USA, 5-16.

MESQUITA, M. E., CARRANCA, C. 2005. "Effects of dissolved organic matter on copper-zinc competitive adsorption by a sandy soil at different pH values". *Environmental Technology*. 26. 1065-1072.

MESQUITA, M. E., CARRANCA, C., VIEIRA, E. S., GUSMAO, R. 2004. "Effect of dissolved organic matter and pH on copper adsorption". *Agrochimica*. XLVIII:5-6. 222-232.

MULLER, A. K., WESTERGAARD, K., CHRISTENSEN, S., SØRENSEN, S. J. 2002. "The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances". *Microbial Ecology*. 44. 49-58.



- NANNIPIERI, P., KANDELER, E., RUGGIERO, P. 2002. "Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil". *Enzymes in the environment, activity, ecology and applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1-33.
- NORTCLIFF, S. 2002. "Standardisation of soil quality attributes". *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 88. 161-168.
- ORWIN, K. H., WARDLE, D. A. 2004. "New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances". *Soil Biology and Biochemistry*. 36:11. 1907-1912.
- PARENT, L. E. CARON, J. 1993. "Analysis of organic soils". *Soil sampling and methods of analysis*, Lewis publishers, Boca Raton, Florida, 450-452.
- PAUL, E. A. CLARK, F. E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 340.
- PIMM, S. L. 1984. "The complexity and stability of ecosystems". *Nature*. 307. 321-326.
- PROSSER, J. I. 1997. "Microbial processes within the soil". *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 683.
- SAUVÉ, S. 2002. "Speciation of metals in soils". *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*, SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, 7-37.
- SAUVÉ, S. 2003. "The role of chemical speciation in bioavailability". *Bioavailability, toxicity and risk relationships in ecosystems*, Science publishers, Enfield, NH, 344.

SAUVÉ, S. 2006. "Copper inhibition of soil organic matter decomposition in a seventy-year field exposure". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25:3. 854-857.

SAUVÉ, S., HENDERSHOT, W. H., ALLEN, H. E. 2000. "Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: Dependence on pH, total metal burden, and organic matter". *Environmental Science and Technology*. 30:7. 1125-1130.

SAUVÉ, S., MCBRIDE, M. B., HENDERSHOT, W. H. 1995. "Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 29. 373-379.

SAUVÉ, S., MCBRIDE, M. B., NORVELL, W. A., HENDERSHOT, W. H. 1997. "Copper solubility and speciation of in-situ contaminated soil: Effects of copper level, pH and organic matter." *Water, Air and Soil Pollution*. 100. 133-149.

SEYBOLD, C. A., HERRICK, J. E., BREJDA, J. J. 1999. "Soil resilience: A fundamental component of soil quality". *Soil Science*. 164:4. 224-234.

SIX, J., BOSSUYT, H., BDEGRYZE, S., DENEFF, K. 2004. "A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics". *Soil and Tillage Research*. 79. 7-31.

SMIT, C. E., VAN GESTEL, C. A. M. 1998. "Effects of soil type, prepercolation and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *folsomia candida*". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17:6. 1132-1141.

SMOLDERS, E., BRANS, K., COPPENS, F., MERCKX, R. 2001. "Potential nitrification rate as a tool for screening toxicity in metal-contaminated soils". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:11. 2469-2474.

SMOLDERS, E., MC GRATH, S. P., LOMBI, E., KARMAN, C. C., BERNHARD, R., COOLS, D., VAN DEN BRANDE, K., VAN OS, B., WALRAVE, N. 2003. "Comparison of toxicity of zinc for soil microbial processes between laboratory-contaminated and pollutes field soils". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22:11. 2592-2598.

SOJKA, R. E., UPCHURCH, D. R. 1999. "Reservation regarding the soil quality concept". *Soil Science Society of America Journal*. 63:5. 1039-1054.

SØRENSEN, S. J., MULLER, A. K., HANSEN, L. H. RASMUSSEN, L. D. 2002. "Molecular methods for assessing and manipulating the diversity of microbial populations and processes". *Enzymes in the environment: Activity, ecology and applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 363-389.

SOWERBY, A., EMMETT, B., BEIER, C., TIETEMA, A., PEÑUELAS, J., ESTIARTE, M., VAN MEETEREN, M. J. M., HUGHES, S., FREEMAN, C. 2005. "Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: Interaction with climate change manipulations". *Soil Biology and Biochemistry*. 37. 1805-1813.

- SPEIR, T. W., ROSS, D. J. 2002. "Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery". *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*, Marcel Dekker, New York, 407-431.
- SPOSITO, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New York, Oxford, 277.
- STEWART-OATEN, A., MURDOCH, W. W. 1986. "Environmental impact assessment: "Pseudoreplication" In time?" *Ecology*. 67:4. 929-940.
- STOTZKY, G. 1997. "Soil as an environment for microbial life". *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1-20.
- STRUCZYNSKI, T. I., MCCARTY, G. W., SIEBIELEA, G. 2003. "Response of soil microbiological activities to cadmium, lead and zinc salt amendments". *Journal of Environmental Quality*. 32. 1346-1355.
- TABATABAI, M. A. 1994. "Soil enzymes". *Methods of soil analysis: Part 2 - microbiological and biochemical properties*, SSSA, Winsconsin, 775-833.
- TRASAR-CEPEDA, C., LEIRÓS, M. C., SEOANE, S., GIL-SOTRES, F. 2000. "Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution". *Soil Biology and Biochemistry*. 32. 1867-1875.
- TREVORS, J. T., VAN ELSAS, J. D. 1997. "Microbial interaction in soil". *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 683.

UNEP 2002. "State of the environment and policy retrospective: 1972–2002: Land". *Global environment outlook 3*, Earthscan publications Ltd, London, Sterling, VA, 416.

USDA. 2005. Soil Properties and Qualities: Particle Size (618.42). In. Natural Resources Conservation Service of the United States Department of Agriculture. [En ligne]. <http://soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part618p3.html> (page consultée le 26 avril 2006)

VANLOON, G. W., DUFFY, S. J. 2000. *Environnemental chemistry: A global perspective*, Oxford university press, New York, 489.

WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M., PEAKALL, D. B. 2001. *Principles of ecotoxicology*, Taylor and Francis, New York, NY, USA, 309.

WUERTZ, S., MERGEAY, M. 1997. "The impact of heavy metals on soil microbial communities". *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York, Basel, 683.

YIN, Y., IMPELLITTERI, C. A., YOU, S.-J., ALLEN, H. E. 2002. "The importance of organic matter distribution and extract soil:Solution ratio on the desorption of heavy metals from soils". *The Science of the Total Environnement*. 287. 107-119.

VALIDATION D'UN INDICE DE LA STABILITÉ RELATIVE  
DES SOLS PAR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ  
ENZYMATIQUE DANS LE CONTEXTE D'UNE  
CONTAMINATION AU CUIVRE

**Annexes**

## Annexe 1. Protocoles expérimentaux

 <b>CIRAIG</b> Centre Interuniversitaire de Référence sur l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle de vie des produits, procédés et services		<b>PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL</b>	
Protocole : PE-66-A		Nombres de pages : 7	
Version : 4		Date : 22 juillet.2005	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____			
Approuvé par : _____ _____ _____		Signatures : _____ _____ _____ Date :	

A1-1 : Caractérisation d'un sol

Mots clés : Caractérisation, pH, CRC, CIT, COT, tamisage.

### **A1-1.1        OBJECTIF**

L'objectif des analyses et manipulations rapportées dans ce protocole est de connaître les propriétés physico-chimiques d'un sol. La connaissance des caractéristiques des sols permet, lors de l'utilisation de celui-ci comme matrice dans le cadre d'études écotoxicologiques, de mieux comprendre les phénomènes et processus biogéochimiques qui ont cours dans les sols en présence de contaminant. Les caractéristiques des sols peuvent servir de connaissances de base pour en modifier certains paramètres ou l'évaluation de l'état d'un sol permettant des corrélations avec les résultats expérimentaux.

### **A1-1.2        MATÉRIEL**

- Tamis 2 mm (no 10)
- Pelle de jardin
- Matériel pour PSO-A23
- Matériel pour PSO-A5
- 5 pots de plastique pour les échantillons à faire analyser au laboratoire externe (Maxaam).
- Matériel pour PE-33-A



### **A1-1.3 MÉTHODOLOGIE**

#### **A1-1.3.1 Tamisage et homogénéité**

Le tamisage des sols est une partie essentielle à la préparation des sols qui seront soumis à n'importe quelle analyse au laboratoire. Il est important de respecter la préparation habituellement utilisée afin de pouvoir comparer ses résultats avec les résultats publiés par d'autre groupe de recherche.

Après avoir échantillonné le sol de surface (0-20cm), tamiser à l'aide d'un tamis de 2 mm (U.S.A. standard testing sieve, A.S.T.M. E-11 specification No 10)

- Pour faciliter le tamisage, étendre le sol non-tamisé sur une toile de plastique et laisser sécher une nuit.
- Tamiser
- Bien mélanger le sol tamisé à l'aide d'une petite pelle de jardin.
- Entreposer à la température de la pièce dans une chaudière avec un couvercle pour conserver l'humidité du sol.

#### **A1-1.3.2 Capacité de rétention au champ (CRC)**

La CRC doit être connue pour pouvoir maintenir un taux d'humidité relatif constant entre les diverses expériences sur les sols. Cette constance permet d'assurer la comparaison des différents résultats. La CRC est la capacité d'un gramme de sol sec à retenir de l'eau. Cette mesure s'exprime en g d'eau par g de sol sec.

La méthodologie pour mesurer la CRC est rapportée dans le protocole PSO-A23.

Note : Il est préférable d'utiliser une petite quantité de sol et d'eau pour effectuer le PSO-A23. De plus, il est plus facile d'utiliser un entonnoir et d'effectuer une filtration par gravité et non un Buchner comme il est indiqué dans le protocole PSO-A23.

### **A1-1.3.3      pH**

Le pH est un facteur très important. Le pH régit plusieurs processus biogéochimiques des sols, par exemple : la spéciation des métaux, la capacité d'échange cationique et anionique (CEC, CEA), l'activité biologique de la faune et la flore terrestre, etc. Le pH est une échelle logarithmique représentant l'activité des ions  $H^+$  dans le milieu aqueux (phase soluble du sol).

La méthodologie pour mesurer le pH est rapportée dans le protocole PSO-A5.

### **A1-1.3.4.      Granulométrie du sol**

La granulométrie est la détermination de la proportion des différents types de particules solides (gravier, sable, limon, argile) dont un sol est composé afin de l'identifier aux différentes classes de sol. La méthodologie de la granulométrie se fait généralement en deux parties. La première, par tamisage, permet de séparer les particules plus grossières (sable grossier, moyen, fin) et la deuxième, par hydrométrie, permet de déterminer la proportion de limon et d'argile dans les particules fines.

Cette analyse est effectuée par le département de génie géologique de la Polytechnique.

- Préparer un échantillon d'environ 600g dans un sac plastique refermable, bien identifié.

### A1-1.3.5 COT

Le carbone organique total dans le sol est directement relié à son contenu en matière organique. Cette information est nécessaire à la caractérisation d'un sol étant donné que la quantité de matière organique est un des paramètres des sols influençant le plus les processus biogéochimique avec le pH.

La méthodologie pour mesurer les solides volatiles qui donne une indication du COT est rapportée dans le protocole PE-33-A. Les laboratoires externes offrent un service de mesure du COT par fumigation. Il est possible de mesurer le contenu en COT, et par conséquent en M.O., par titrage au dichromate de potassium. Cette méthode est plus rigoureuse que celle de solide volatile. Le protocole est disponible aux pages 10-13 du manuel de Méthodes de laboratoire en pédologie (COURCHESNE, F. *et al.*, 2002).

Note :

- À titre indicatif, utiliser le PE-33-A pour évaluer le contenu en matière organique. Lorsqu'il est nécessaire d'avoir une valeur quantitativement fiable, il est recommandé d'avoir recours au service d'un laboratoire externe ou à la méthode par titration.
- Pour connaître le contenu en matière organique de l'échantillon analysé, vous devez multiplier le résultat par le facteur suivant : 1,724 (COURCHESNE, F. *et al.*, 2002).

#### **A1-1.3.6 CIT**

Le carbone inorganique dans les sols est généralement relié à la présence de carbonate sous forme de calcite( $\text{CaCO}_3$ ) et de dolomite [ $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ] (CARTER, M.R., 1996).

Les carbonates sont responsables de la capacité tampon du sol, donc cette information est très utile lorsqu'on prévoit modifier le pH original d'un sol.

Cette analyse est effectuée par le laboratoire externe de MAXAAM.

- Préparer un échantillon d'environ 20g dans un pot de plastique couvert et bien identifié.

#### **A1-1.3.7 Métaux**

Il est important d'évaluer la présence de métaux dans le sol qui sera utilisé pour l'étude.

D'autant plus que l'étude repose sur l'effet écotoxicologique des métaux dans les sols.

Les métaux présents dans le sol doivent être en concentration trace sous le seuil du critère A établi par le Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs du Québec (Québec, 1999).

Cette analyse se fait par ICP-MS sur 22 métaux incluant le cuivre. Elle sera confiée au laboratoire externe MAXAM.

- Préparer un échantillon d'environ 20g dans un petit pot de plastique refermable, bien identifié.

#### **A1-1.4 SANTÉ ET SÉCURITÉ**

Il est important de porter des lunettes de laboratoire, des gants et un sarrau en tout temps au laboratoire. Il est nécessaire d'utiliser des gants isothermiques pour les manipulations à 550°C.

#### **A1-1.5 RÉFÉRENCES**

Courchesne, F. and. Turmel, M.-C, *Méthodes de laboratoire en pédologie*, ed. D.d. géographie. 2002, Montréal: Université de Montréal. 52.

CARTER, R. M. 1993. *Soil sampling and methods of analysis*, Lewis Publishers, Boca Raton, 823.

Gouvernement du Québec, *Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés*, S.d.l.c. Direction des politiques de secteur industriel, du Ministère de l'environnement, Editor. 1999, Les publications du Québec. p. 124.


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-B	Nombres de pages : 7	
Version : 4	Date : 22 juillet.2005	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-2 : Amendement d'un sol en matière organique.

Mots clés : M.O., tourbe, lavage, substances humiques.

### **A1-2.1 OBJECTIF**

L'objectif de ce protocole est d'amender en matière organique un sol dont le contenu initial est d'environ 2 g OM/kg sol sec pour produire des échantillons contenant environ 5 g OM/kg sol sec et 8 g OM/kg sol sec. Cette procédure permet d'obtenir trois échantillons de sol dont seule la proportion de matière organique diffère. Ceci permet de faciliter des corrélations statistiques entre les résultats expérimentaux et les propriétés physiques des sols.

### **A1-2.2 MATÉRIEL**

- Matériel pour PSO-A-5, pH
- Matériel pour PE-35-D, substance humique
- Matériel pour PE-A-7, poid sec
- 10 pots en plastique de 2 L
- Rotateur environnemental TCLP
- Tourbe de sphaigne (contient 95-99%), Tourbières Berger Ltée
- 2 X 10 kg sol Ste-Anne #3
- Eau Millipore, résitivité de 18,2  $\Omega$ .

### **A1-2.3 MÉTHODOLOGIE**

Le design expérimental proposé dans le cadre de l'étude est de préparer, à partir d'un sol de référence naturel, 18 échantillons en faisant varier une seule propriété physique à

la fois. Au total, 3 concentrations différentes de M.O. (2, 5, 8) g OM/kg sol sec, 2 pH (5,6 et 7) et 3 concentrations de contamination composeront les 18 différents échantillons.

L'amendement en M.O. sera effectué avec de la tourbe de jardin. 10 kg de sol pour chacun des pourcentages seront préparés.

#### **A1-2.3.1 Lavage de la tourbe**

La tourbe doit être préalablement lavée afin de limiter les variations de pH que pourrait occasionner l'ajout de celle-ci au sol mère (généralement acide), d'éliminer les débris solubles et de réduire la proportion de particules très fines (GRAVELLE *et al.*, 1980).

1. Sécher la tourbe à l'air libre, en l'étendant sur une toile de plastique, pendant au moins 12 heures afin de faciliter le tamisage.
2. Tamiser la tourbe à l'aide d'un tamis de 2 mm (No10).
3. Laver un réceptacle de plastique d'environ 60 cm X 40 cm de la façon suivante :
  - Rinçage à l'eau distillée
  - Lavage avec une solution aqueuse de Sparkleen
  - Rinçage à l'eau distillée
  - Rinçage à l'acétone, laisser sécher à l'air.
  - Rinçage à l'H<sub>2</sub>O Millipore



4. Peser environ 2 kg de tourbe et étendre uniformément dans le réceptacle de plastique.
5. Émerger la tourbe d'eau Millipore, mettre environ 4 cm d'eau (voir notes à la fin).
6. Laisser reposer 24 heures.
7. Égoutter la tourbe à l'aide de chiffon J ou de coton-fromages.
8. Mesurer le pH de la tourbe selon le protocole PSO-A-5
9. Répéter 2 fois.

#### **A1-2.3.1      Caractérisation de la tourbe**

La tourbe contient, d'après le distributeur, entre 95 et 99% de matière organique, en plus des substances humiques, elle contient des débris. Afin de connaître la proportion des matières humiques, il est intéressant de procéder à l'extraction des diverses substances.

La séparation des substances humiques (acides humiques, acide fluviqes et humins) est effectuée selon le protocole expérimental PE-35-D.

ATTENTION : NE PAS UTILISER DE COUPELLE D'ALUMINIUM COMME IL EST RECOMMANDÉ DE LE FAIRE DANS LE PE-35-D. LES SOLUTIONS ACIDES UTILISÉES POUR EXTRAIRE LES SUBSTANCES HUMIQUES DISSOLVENT L'ALUMINIUM.

### **A1-2.3.2 Poids sec de la tourbe**

Il est important de connaître le taux d'humidité de la tourbe afin d'amender le sol de la bonne quantité de matière organique. Le calcul d'humidité doit être effectué en fonction de la masse de sol sec.

Le poids sec de la tourbe est effectué selon la méthodologie prescrite dans le protocole PE-A-7.

### **A1-2.3.3 Amendement du sol de base avec de la tourbe**

Pour la totalité des analyses 30 kg de sol est nécessaire, soit : 10kg à 2,07 g OM/kg sol sec de M.O., 10kg à 5,06 g OM/kg sol sec de M.O. et 10kg à 8,06 g OM/kg sol sec de M.O.

Pour l'amendement d'une première série de 10 kg :

- 10 pots en plastique de 2 litres chacun sont remplis par 1 kg de mélange de sol sec (e.g. 969 g de sol de base (tamisé et homogénéisé) et 31 g de tourbe sèche).
- À l'aide des pourcentages d'humidité du sol et de la tourbe, ajouter la quantité nécessaire de sol humide et de tourbe humide dans le pot. Noter les masses.

Calculs

$$1 \text{ kg de sol amendé} = M_s + T_s \quad (1)$$

$$\%M.O. = (A_s * M_s + T_s) / (M_s + T_s) \quad (2)$$

Nous avons ici, 2 équations et 2 inconnus, car le %M.O que nous voulons obtenir est connu. En isolant  $M_s$  et  $T_s$  nous savons combien de sol sec et de tourbe sèche il faut mélanger ensemble. Il ne reste qu'à convertir ces résultats en sol et tourbe humide.

$$M_h = M_s * B_M$$

$$T_h = T_s * B_T$$

Où  $T_s$  = Masse de tourbe sèche (g)

$T_h$  = Masse de tourbe humide (g)

$M_s$  = Masse de sol sec (g)

$M_h$  = Masse de sol humide (g)

$B_M$  = Humidité du sol (g d'eau/ g de sol sec)

$B_T$  = Humidité de la tourbe (g d'eau/ g de tourbe sèche)

$A_s$  = Contenu en M.O. du sol de base (g de M.O./g de sol sec)

- Introduire les pots de 2L dans le mélangeur rotatif pour au moins 12 heures.

Ceci permet une bonne homogénéisation du sol.

#### **A1-2.4 SANTÉ ET SÉCURITÉ**

Il est important de porter des lunettes de laboratoire, des gants et un sarrau en tout temps au laboratoire.

**A1-2.5 RÉFÉRENCE(S)**

PE-A7

PE-35-D

PSO-A-5.

GRAVELLE, D. V., LANDREVILLE, A. (1980). "Caractéristiques de la tourbe pour le traitement des eaux usées d'abbatoirs." The Canadian Journal of Chemical Engineering **58**: 235-240.

**A1-2.3.6 RECOMMANDATION(S)**

- Section 3.1 étape 5 : la tourbe et l'eau ne se mélangent pas naturellement. L'eau, ayant une densité plus élevée, se retrouve sous la tourbe. Afin de bien humidifier la tourbe, il faut incorporer en brassant avec une cuillère de plastique les 2 phases.
- Section 3.4 calculs : nous avons considéré que la tourbe contenait 100% de M.O. Il est possible de considérer le contenu réel en multipliant Ts par le pourcentage associé au contenu en M.O.


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-D	Nombres de pages : 4	
Version : 4	Date : 23 décembre 2005	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-3 : Modification du pH d'un sol.

Mots clés :  $\text{CaCO}_3$ , modification du pH, homogénéisation, chaulage.

### **A1-3.1 OBJECTIF**

L'objectif de ce protocole est de modifier le pH naturel d'un sol avec du carbonate de calcium pour augmenter le pH du sol. L'amendement en  $\text{CaCO}_{3(s)}$  permet d'augmenter le pH jusqu'à environ 7. Cette procédure permet d'obtenir 2 pH différents pour chaque série de sol (M.O. : 27, 57, 78 g MO/kg sol sec) tout en minimisant l'impact sur la flore naturelle du sol.

### **A1-3.2 MATÉRIEL**

- Matériel pour PSO-A-5
- Cuillères en plastiques
- 15 pots en plastique (HDPE) de 2L
- Balance Mettler PE16, 0,1g de précision.
- Agitateur rotatif environnemental TCLP à 50 rpm
- $\text{CaCO}_3$ , Anachemia, AC-1940.

### **A1-3.3 MÉTHODOLOGIE**

Le design expérimental proposé dans le cadre de l'étude consiste à la préparation de 18 échantillons à partir d'un sol de référence en faisant varier une seule propriété physique à la fois. Au total, 3 concentration différente de M.O. (27, 57, 78) g MO/kg sol sec, 2 pH (acide et neutre) et 3 concentrations de cuivre (0, 250, 750) mg de cuivre /kg de sol sec composeront les 18 différents échantillons.

La modification du pH sera effectuée avec du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) solide. La moitié de chacun des sols amendés en matière organique (27, 57 et 78g MO/kg sol sec), soit 5 kg de sol pour chacun des amendements en M.O., seront amendé de  $\text{CaCO}_{3(s)}$ .

#### **A1-3.3.1 Pré-expérimentation**

La quantité  $\text{CaCO}_3$  nécessaire pour effectuer un changement de pH dans un sol dépend des propriétés physiques du sol (matière organique, contenue en aluminium échangeable, etc.) (Carter, 2000). Il existe des régressions pour l'amendement en  $\text{CaCO}_{3(s)}$  d'un sol, mais celles-ci sont établies pour de grandes quantités de sol (de l'ordre de la tonne). De plus, il est nécessaire de connaître le pouvoir tampon du sol pour les utiliser. Une autre approche consiste à établir expérimentalement les besoins en  $\text{CaCO}_{3(s)}$  adéquat, spécifiquement pour les sols amendés de cette étude, pour obtenir le pH voulu. Cette dernière option a été sélectionnée. La procédure a été décrite ci-dessous:

1. Préparer des échantillons contenant 10g de sol sec du sol de base (27 g MO/kg sol sec) dans des tubes à centrifuger. Faire varier la concentration de  $\text{CaCO}_3$  dans les échantillons entre 0,1% à 3% (w\w). Par exemple, pour 8 échantillons les concentrations sont : 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%.
2. Prendre les mesures de pH selon le protocole PSO-A5.
3. Refaire une autre série de pré-tests, mais cette fois-ci avec le sol amendé à 78 g MO/kg sol sec. Il n'est pas nécessaire de refaire toutes les concentrations de  $\text{CaCO}_3$  effectuées à l'étape 1, cette étape permet plutôt de s'assurer que la

concentration de  $\text{CaCO}_3$  sélectionnée augmente le pH à la même valeur que dans le sol de base. Par exemple, mesurer le pH du sol dont l'amendement  $\text{CaCO}_{3(s)}$  est de 0,5% et 1% (w/w)  $\text{CaCO}_{3(s)}$ .

Note : Il est recommandé de ne pas dépasser 2% (w/w) lors d'essai en laboratoire (McLaughlin *et al.*, 2002).

#### **A1-3.3.2 Amendement en carbonate de calcium**

1. 5 kg de chacune des trois séries subiront une modification du pH naturel du sol par ajout de  $\text{CaCO}_3$ . Dans le cas présent, un ajout de 1% de  $\text{CaCO}_3$  a été choisi pour neutraliser le sol. Le protocole suit les étapes suivantes :
2. Effectuer les poids sec pour le sol de chacune des séries afin de connaître le pourcentage d'humidité (par rapport au poid sec).
3. Pour chaque série prendre 5 pots de 2L en plastique (HDPE) propres.
4. Introduire 10,0 g de  $\text{CaCO}_3$  dans chaque contenant de 2L.
5. Ajouter le sol à l'équivalent de 990 g de sol sec.
6. Mettre sous agitateur rotatif pour 24 heures.
7. Homogénéiser manuellement le contenue des 5 pots du même traitement de sol ensemble à l'aide d'une cuillère de téflon.
8. Prendre le pH en suivant le protocole PSO-A5, et noter le résultat.



**A1-3.4        Calculs**

Calculs pour connaître la quantité de sol humide à ajouter afin d'obtenir 990g de sol sec.

$$M_{SH} = M_{SS} * (1 + H)$$

$M_{SH}$  = masse de sol humide (g)

$M_{SS}$  = masse de sol sec (= 990) (g)

H = Taux d'humidité du sol (g d'eau / g de sol sec)

**A1-3.5        SANTÉ ET SÉCURITÉ**

Le port du sarrau et des lunettes de sécurité est obligatoire.

**A1-3.6        RÉFÉRENCE**

MCLAUGHLIN, M. J., HAMON, R. E., PARKER, D. R., PIERZYMSKI, G. M., SMOLDERS, E., THORNTON, I. WELP, G. 2002. "Soil chemistry". Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils, SETAC Press, Pensacola, Fl, USA, 5-16.


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'Interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-E	Nombres de pages : 12	
Version : 4	Date : 2 avril 2006	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-4 : Contamination d'un sol au cuivre

Mots clés : Cuivre, contamination,  $\text{CuCl}_2$ , cycle séchage/mouillage, lixiviation,  
Chlorure de cuivre.

#### **A1-4.1          Objectif**

L'objectif de ce protocole est de contaminer un sol en essayant de reproduire l'équilibration des contaminants qui a lieu lors du vieillissement naturel d'une contamination dans un sol. Le protocole qui suit est basé sur la méthodologie développée par le laboratoire de chimie environnementale du Prof. Sauvé de l'Université de Montréal pour effectuer une contamination métallique sur un sol.

Les sols des séries *La*, *Lb*, *Ma*, *Mb*, *Ha* et *Hb* seront, en partie, contaminé à 250 et 750 mg de Cu /kg de sol sec, soit les concentrations représentant les critères une plage entre les critères B-C et C-2C selon la législation en place au Québec (Québec, 1999).

#### **A1-4.2          Matériel**

- Matériel pour PSO-A-5
- 2 Ballons jaugées de 500 mL
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (FW 170,49), Anachemia AC-2657, [10123-13-0], lot: 690612-Y6
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (FW :147,01), Anachemia 18706-380, [10035-04-8], lot: 400309
- Eau Millipore, résistivité de 18,2  $\Omega \cdot \text{cm}$
- 18 Plats en pyrex
- 18 tubes d'ABS de 17,78 cm de diamètres
- Membrane géotextile : toile « weedbarrier », Canadian tire produit no 59-1891-4
- 18 attaches en velcro, One-Wrap (38,1 cm x 13mm)

- 9 Bacs en plastique
- Sable standard «Ottawa», Accusand® par Unimin corporation produit # 88-00120-11-01
- 18 pots en plastique de 2 litres

### **A1-4.3 Méthodologie**

Un tiers de chaque série, et pour chaque pH, sera contaminé à 250 mg de Cu/kg (1,5 kg), une autre partie égale sera contaminé à 750 mg de Cu/kg (1,5 kg) et le reste de demeurera sain (1,5 kg). Afin de normaliser la concentration de l'anion chlorure dans tous les échantillons, on ajoutera une solution de  $\text{CaCl}_2$ . Naturellement, il faut prévoir des pertes de cuivre suite à la lixiviation du sol à la fin des cycles séchages/mouillages. Ainsi, le niveau de contamination final est inconnu. Il est toutefois prévu que les niveaux entre échantillons ayant subi le même traitement seront semblables.

#### **A1-4.3.1 Préparation**

##### **A1-4.3.1.1 Lavage à l'acide**

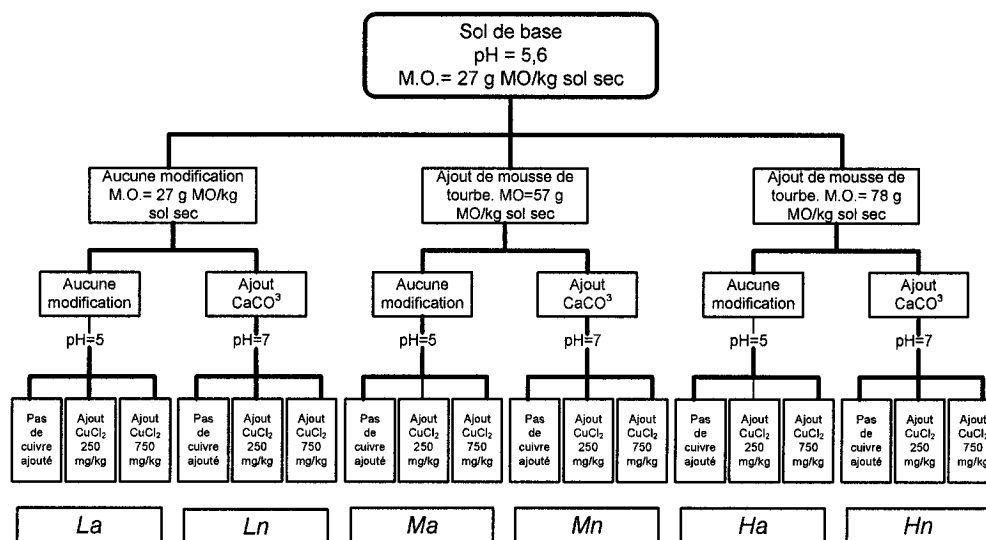
Vu que les expériences portent sur la contamination métallique des sols (le cuivre), il est important (lorsque nécessaire) de laver la verrerie et les instruments de laboratoire à l'acide. Le cas échéant, les lavages à l'acide se font selon la méthodologie suivante :

Le matériel est trempé pour une période d'au moins 12 heures (une nuit) dans un bain d'acide nitrique 10%. Ce trempage permet la solubilisation des métaux résiduels

pouvant adhérer aux parois du matériel. Ensuite, les instruments sont rincés trois fois à l'eau purifiée par osmose inverse et trois fois à l'eau millipore.

#### A1-4.3.1.2 Pyrex

1. Laver les plats de Pyrex propre à l'acide (trempage dans un bain d'acide pendant 24hres) afin d'éliminer toute contamination métallique étrangère.
2. Identifier les plats de Pyrex aux échantillons de sol qu'ils contiendront comme élaboré à la Figure A1- 1.



**Figure A1- 1 : Design expérimental des différents traitements des sols.**

#### A1-4.3.1.3 Pot en plastique de 2L

1. Laver les pots en plastique de 2L avec de l'eau et du savon Sparkleen.
2. Rincer à l'eau distillée et Millipore.
3. Laisser sécher à l'air.

4. Identifier les pots selon l'annexe.

#### **A1-4.3.1.4 Introduction de 1,5 kg de sol sec par pot de 2L**

1. Peser exactement la masse de sol humide correspondant à 1,5 kg de sol sec. Les masses de sol sec correspondant à chacun des échantillons sont répertoriées au tableau 1.

**Tableau A1- 1 : Masse de sol sec à introduire selon l'échantillon**

NOM	MASSE SOL SEC (g)	TAUX D' HUMIDITÉ (g d'eau/ g de sol sec)	MASSE DE SOL HUMIDE (g)
<i>La-1</i>	1500	0,071	1606,5
<i>La-2</i>	1500	0,071	1606,5
<i>La-N</i>	1500	0,071	1606,5
<i>Lb-1</i>	1500	0,071	1606,5
<i>Lb-2</i>	1500	0,071	1606,5
<i>Lb-N</i>	1500	0,071	1606,5
<i>Ma-1</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Ma-2</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Ma-N</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Mb-1</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Mb-2</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Mb-N</i>	1500	0,101	1651,5
<i>Ha-1</i>	1500	0,134	1701
<i>Ha-2</i>	1500	0,134	1701
<i>Ha-N</i>	1500	0,134	1701
<i>Hb-1</i>	1500	0,134	1701
<i>Hb-2</i>	1500	0,134	1701
<i>Hb-N</i>	1500	0,134	1701

### **A1-4.3.2 Préparation des solutions**

#### **A1-4.3.2.1 Solution de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M**

2. Peser exactement 42,62g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans un ballon jaugé de 500 mL.
3. Dissoudre et ajuster au trait de jauge avec de l'eau Millipore.

#### **A1-4.3.2.2 Solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M**

1. Peser exactement environ 36,75g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans un ballon jaugé de 500 mL.
2. Dissoudre et ajuster au trait de jauge avec de l'eau Millipore.

### **A1-4.3.3 Contamination**

La contamination se fait de façon assez simple. Avant de passer à l'ajout de la solution de cuivre ou de chlorure de calcium. Il faut calculer le volume de solution de sel de cuivre et de solution de sel de calcium à ajouter en fonction de la masse de sol sec dans chaque pot en plastique et du niveau de contamination recherché.

1. Ajouter le volume de solution de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  associé à l'échantillon à la pipette en dispersant le plus uniformément possible les gouttes de solution à travers le sol dans le pot en HDPE de 2L. Les volumes nécessaires sont rapportés au tableau 2.
2. Ajouter le volume de solution de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  associé à l'échantillon à l'aide d'une pipette en dispersant le plus uniformément possible les gouttes de solution à travers le pot de 2L. Les volumes nécessaires sont rapportés au tableau 2.

3. Homogénéiser pendant 24hres sur le rotateur mécanique.
4. Passer immédiatement à l'étape 1 de la section 3.4- cycles séchages-mouillages.

**Tableau A1- 2 : Contamination des échantillons au cuivre.**

NOM	NIVEAU DE CONTAMINATION (mg Cu/kg sol)	VOLUME DE SOLUTION DE CuCl <sub>2</sub> 0,5M (mL)	VOLUME DE SOLUTION DE CaCl <sub>2</sub> 0,5M (mL)
<i>La-1</i>	250	11,80	23,60
<i>La-2</i>	750	35,41	0
<i>La-N</i>	0	0	35,41
<i>Lb-1</i>	250	11,80	23,60
<i>Lb-2</i>	750	35,41	0
<i>Lb-N</i>	0	0	35,41
<i>Ma-1</i>	250	11,80	23,60
<i>Ma-2</i>	750	35,41	0
<i>Ma-N</i>	0	0	35,41
<i>Mb-1</i>	250	11,80	23,60
<i>Mb-2</i>	750	35,41	0
<i>Mb-N</i>	0	0	35,41
<i>Ha-1</i>	250	11,80	23,60
<i>Ha-2</i>	750	35,41	0
<i>Ha-N</i>	0	0	35,41
<i>Hb-1</i>	250	11,80	23,60
<i>Hb-2</i>	750	35,41	0
<i>Hb-N</i>	0	0	35,41



Exemple de calculs :

$$250 \text{ ppm} = 250 \text{ mg/kg de sol}$$

Il y a 1,5 kg de sol par Pyrex, donc 375 mg de Cu par Pyrex

$$\text{MM Cu} = 63,546 \text{ g/mol}$$

$$N \text{ mol de Cu} = 375 \times 10^{-3} \text{ g de Cu} / 63,546 \text{ g/mol}$$

$$N \text{ mol de Cu} = 5,9012 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

La solution de  $\text{CuCl}_2$  est de 0,5 M.

$$\text{Volume de solution à ajouter} = 5,9012 \times 10^{-3} \text{ mol} / 0,5 \text{ mol/L} = 0,0118 \text{ L}$$

#### **A1-4.3.4 Cycle mouillage/séchage**

Après la contamination et l'homogénéisation des sols de chaque série, il est important de mesurer la capacité de rétention au champ de chacune d'elle. Celles-ci sont alors transférées dans des pyrex (style plat à lasagne) pour effectuer des cycles mouillages/séchages. Étant donné l'espace limité dans l'étuve et de la quantité de pyrex à y entreposer, les échantillons ont été séparés en deux groupes décalés de quelques jours. L'horaire des manipulations est rapporté au Tableau A1- 3. Les groupes sont divisés comme suit :

- Groupe 1 : Série *La* et *Ln* au complet plus les échantillons de la série *Ma*.
- Groupe 2 : Série *Ha* et *Hn* au complet plus les échantillons de la série *Mb*.

**Tableau A1- 3 : Horaire des manipulations reliées aux cycles mouillages et à la lixiviation**

Date	Manipulation
19 novembre 2004	Humidification groupe 1
22 novembre 2004	Humidification groupe 2 / Étuve groupe 1
23 novembre 2004	Repos 3 jours groupe 1
25 novembre 2004	Étuve à 37°C groupe 2
26 novembre 2004	Humidification groupe 1 / Repos 3 jours groupe 2
29 novembre 2004	Humidification groupe 2 / Étuve Gr.1
30 novembre 2004	Repos 3 jours groupe 1
2 décembre 2004	Étuve à 37°C groupe 2
3 décembre 2004	Humidification groupe 1 / Repos 3 jrs Gr.2
6 décembre 2004	Humidification groupe 2 / Étuve groupe 1
7 décembre 2004	Repos 3 jours groupe 1
9 décembre 2004	Étuve à 37°C groupe 2
10 décembre 2004	Lixiviation groupe 1 / Repos 3 jrs groupe 2
11 décembre 2004	Transfert pyrex groupe 1
13 décembre 2004	Étuve groupe 1 et Lixiviation groupe 2
14 décembre 2004	Entreposage groupe 1 et transfert pyrex groupe 2
16 décembre 2004	Étuve à 37°C groupe 2
17 décembre 2004	Entreposage groupe 2

1. Pour les échantillons de la série *La*, *Ln*, *Ma* et *Mn* utilisé les Pyrex de 34cm par 22cm. Transvider les pots de plastiques dans les pyrex identifiés avec le contenu du pot de l'échantillon approprié.

2. Pour les échantillons de la série *Ha* et *Hn* utiliser les Pyrex de 25cm par 38cm. Remplir les pyrex identifiés avec le contenu du pot associé à l'identification (dans la mesure du possible s'assurer que l'épaisseur de la couche de sol dans le plat n'excède pas 3 cm).
3. En connaissant la masse de sol sec contenue dans les pyrex, ajouter l'eau Millipore nécessaire pour atteindre 92% de la capacité de rétention au champ (considérer le taux d'humidité et les volumes de solution ajoutés à la section 3.3).
4. Peser et noter la masse des pyrex contenant le sol contaminé et humidifier à 92% de sa CRC.
5. Laisser reposer à la température de la pièce 3 jours. Noter l'heure de début et de fin du repos.
6. Au premier cycle, mélanger un peu les sols afin d'améliorer l'oxygénation des échantillons à l'aide d'instruments de plastique à utilisation unique. Mettre à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.
7. Laisser reposer à la température de la pièce pour 3 jours. Noter l'heure de début et de fin du repos.
8. Réhumidifier en pesant le pyrex et en rajoutant de l'eau Millipore jusqu'à la masse notée au point 4 afin que les mouillages soit à un taux d'humidité constant.

9. Répéter les étapes 5 à 8 deux autres fois. La manipulation a une durée totale de 3 semaines comptabilisant 3 cycles mouillages/séchages.

#### **A1-4.3.5 Lixiviation**

La lixiviation permet de se débarrasser du surplus d'anions occasionné par la contamination. Dans le cas présent, l'anion en excès est le chlorure (Cl<sup>-</sup>). La lixiviation a lieu après 3 cycles séchage/mouillage soit 3 semaines après le début de la manipulation. La manipulation se fera en deux étapes comme indiquées au Tableau A1-3.

1. Fixer à une extrémité d'un tube en ABS un morceau de membrane géotextile à l'aide des attaches en velcro.
2. Installer le tube dans un lit de sable (l'extrémité bouchée par la membrane sur le sable).
3. Introduire le sol dans le tube. Pour éviter l'obstruction des pores de la membrane, remplir le tube de la moitié du sol de chaque série, donc deux tubes sont utilisés pour chaque échantillon.
4. Lixivier avec un total de 1,5 kg d'eau Millipore, pour chaque échantillon, réparti selon la proportion de sol dans chacun des 2 tubes.
5. Laisser l'eau s'écouler hors du tube pour une nuit.
6. Mettre le sol lixivié dans son plat de Pyrex. Laisser sécher à l'air libre 48 hres et mettre à l'étuve 24 hres.

7. Entreposer dans un pot en plastique propre de 2L pour au moins 2 semaines avant d'initier les premières analyses. Les sols sont entreposés dans le noir à température ambiante.

#### **A1-4.4 SANTÉ ET SÉCURITÉ**

Le port du sarrau et des lunettes de sécurité est obligatoire. Le port de gants de caoutchouc et d'une visière protectrice est nécessaire lors des manipulations impliquant le bain d'acide (lavage des pyrex).

#### **A1-4.5 RÉFÉRENCE(S)**

Gouvernement du Québec, Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés, S.d.l.c. Direction des politiques de secteur industriel, du Ministère de l'environnement, Editor. 1999, Les publications du Québec. p. 124.

#### **A1-4.6 RECOMMANDATION(S)**

Cycle mouillage/séchage : il est important d'être rigoureux dans les manipulations et de s'assurer que chacun des échantillons ait subi un traitement identique. Ainsi, étant donné que les manipulations se font en deux groupes décalés de quelques jours, il faut prendre soin d'uniformiser les temps de repos et d'étuve. Par exemple, le repos de trois jours à température pièce devrait toujours commencer à la même heure et se terminer à la même heure. De cette façon, si le temps de repos à la température de la pièce est de 70 heures au lieu de 72 heures qu'il en soit ainsi pour tous les échantillons pour tous les cycles séchages mouillages.


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-F	Nombres de pages : 10	
Version : 4	Date : 3 janvier.2005	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-5 : Planification temporelle et pratique de la méthodologie dans le cadre du projet de l'analyse de l'activité enzymatique dans le temps sur des sols contaminés

Mots clés : Activité enzymatique, sol contaminé au cuivre, sécheresse, pH, extraction, Spéciation, COD.

### **A1-5.1        OBJECTIF**

L'objectif de ce protocole est d'établir une méthodologie détaillée pour le projet 66 afin d'être rigoureux et d'obtenir des résultats reproductibles. La démarche y est expliquée et les références aux différents protocoles y sont inclut. Il est important d'abord de prendre connaissance de la section NOTES, car elle rapporte les modifications qui ont été apportées aux différents protocoles utilisés en parallèle. Ce protocole vient à la suite des manipulations décrites dans PE-66-E.

### **A1-5.2        MATÉRIEL**

- Matériel pour PSO-A-5
- Matériel pour PE-59-E
- Matériel pour PE-66-G
- Matériel pour PE-66-H
- Matériel pour PE-66-A
- 18 bouteilles à centrifuger de 500 mL
- 1 pipette jaugée de 30 mL
- 1 pipette jaugée de 50 mL
- Support à centrifugeuse (6X500mL)
- Filtre non stérile Millex®-HV 25mm, pore de 0,45 µm.
- Seringues en plastique de 30 mL

- Agitateur Wrist action
- 18 fioles coniques de 125 mL (laver à l'acide et sécher).
- pH-mètre, potentio-mètre.
- Électrode sélective au cuivre, Thermo Ionplus Sure-Flow Cupric Orion 9626BN  
no 1054
- EDTA (FW= 292,25), Fluka, chemica 03610 [60-00-4], lot : 443994/1  
21104117
- 18 pots Masson lavé
- $\text{KNO}_3$  (FW= 101,11), Fluka, biochemika 60414 [7757-79-1], lot :1072987  
53704043
- Potassium acid phthalate (FW=204.22), Anachemia AC-7576 [877-24-7], lot:  
690325
- NaOH (FW= 40,00), Anachemia 83076-300 [1310-73-2], lot :400204
- Iminodiacetic acid disodium (FW=177.07) [928-72-3]
- Cupric(II) nitrate hydrate (FW=465.19), Sigma C2646-100G, [19004-19-4],  
094K3646
- 144 tubes de 15 mL, Corning en plastique stérile



### A1-5.3 MÉTHODOLOGIE

La chronologie des manipulations est présentée dans cette section. Il est à noter que plusieurs manipulations en parallèle sont effectuées pour caractériser les échantillons et sont effectuées selon le protocole PE-66-A (poid sec, pH).

1. Les analyses se font par série (*La*, *Lb*, *Ma*, *Mn*, *Ha* et *Hb*). Pour chaque série, il y a plusieurs étapes à suivre :
2. Préparer les microcosmes et humidifier les sols de façon à atteindre 60 % de la CRC (pour mesurer la CRC se référer au PE-66-A, section A1-1). Incuber dans le noir, à température ambiante pendant 3 jours.
3. Extraire à l'eau pour le suivi de la spéciation, des anions en solution et du carbone organique dissous. Mesurer le pH de la solution de sol extraite ainsi que l'activité des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en solution avec électrode sélective (Sauvé *et al.*, 1995). Mettre la moitié des microcosmes au four à 60°C pendant 17h. Retirer les échantillons perturbés thermiquement du four et humidifier de façon à atteindre 60% de la CRC. Analyser l'activité enzymatique de la Protéase (A1-7), la  $\beta$ -glucosidase (Annexe 1-6) et de l'arylsulfatase (Annexe 1-6) (jour 1).
4. Analyser l'activité enzymatique de la Protéase (Annexe 1-7), la  $\beta$ -glucosidase (A1-6) et de l'arylsulfatase (Annexe 1-6) (jour 2).
5. Analyser l'activité enzymatique de la Protéase (Annexe 1-7), la  $\beta$ -glucosidase (A1-6) et de l'arylsulfatase (Annexe 1-6) (jour 3).

6. Analyser l'activité enzymatique de la Protéase (Annexe 1-7), la  $\beta$ -glucosidase (Annexe 1-6) et de l'arylsulfatase (Annexe 1-6) (jour 4).
7. Extraire à l'eau pour le suivi de la spéciation, des anions en solution et du carbone organique dissous. Mesurer le pH de la solution de sol extraite ainsi que l'activité des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en solution avec électrode sélective (Sauvé *et al.*, 1995).
8. Analyser le contenu en COD des extractions ainsi que le cuivre total soluble.
9. Préparer le matériel nécessaire pour répéter les manipulations sur une nouvelle série.
10. Répéter les étapes 1-9 pour chaque série de sols.

#### **A1-5.3.1 Préparation des microcosmes**

Six pots Masson de 1L, propres, sont préparés pour chaque échantillon de sol (3 subiront une perturbation climatique). Une série comporte 3 échantillons de sol (non-contaminé (N), 250 mg de Cu/kg (1), 750 mg de Cu/kg (2)), donc 18 pots sont nécessaires pour une série d'analyse.

1. Peser l'équivalent de 100g de sol sec par pot.
2. En tenant compte du % d'humidité, ajouter de l'eau Millipore afin d'atteindre 60% de la CRC du sol à l'étude.
3. Refermer les pots et entreposer à l'abris de la lumière et sous des conditions ambiantes (température, humidité normale) pour au moins 72 heures.

Note : Une série comprendre 6 pots du sol propre (X-0), 6 pots contiendront du sol contaminé à 250 mg de Cu/kg (X-1) et 6 pots contiendront du sol contaminé à 750 mg de Cu/kg de cuivre (X-2). ABC sont les triplicatas qui seront perturbés et DEF sont les triplicatas qui ne subiront pas de perturbation. Identifier les pots comme il est présenté au Tableau A1- 4.

**Tableau A1- 4 : Identification des pots**

Sol propre NA (perturbé)	Sol propre NB (perturbé)	Sol propre NC (perturbé)	Sol propre ND (contrôle)	Sol propre NE (contrôle)	Sol propre NF (contrôle)
Sol contaminé 1A (perturbé)	Sol contaminé 1B (perturbé)	Sol contaminé 1C (perturbé)	Sol contaminé 1D (contrôle)	Sol contaminé 1E (contrôle)	Sol contaminé 1F (contrôle)
Sol contaminé 2A (perturbé)	Sol contaminé 2B (perturbé)	Sol contaminé 2C (perturbé)	Sol contaminé 2D (contrôle)	Sol contaminé 2E (contrôle)	Sol contaminé 2F (contrôle)

### **A1-5.3.2 Préparation des solutions**

#### **A1-5.3.2.1 Solution de KNO<sub>3</sub> 2M de qualité trace**

- Peser 22,02 g de KNO<sub>3</sub> qualité trace.
- Transférer dans un ballon de 100 mL.

- Dissoudre avec de l'eau Millipore et ajuster au trait de jauge.

#### **A1-5.3.2.2 Solution d'EDTA 0,05 M (qualité trace)**

- Peser 0,7306 g d'EDTA dans un ballon de 50 mL
- Dissoudre avec de l'eau Millipore et ajuster au trait.

#### **A1-5.3.3 Extraction et conservation des échantillons pour le suivi de la spéciation, des anions, du contenu en COD et mesure du pH**

L'extraction effectuée est une extraction simple à l'eau. De ce surnageant, une partie sera envoyé chez Maxxam, ou congeler, pour l'analyse des anions soluble, une partie sera conservé à température pièce pour l'analyse du COD (conservation d'environ une semaine), une partie sera traité à l'EDTA pour l'analyse du cuivre total en solution et une dernière additionnée de  $\text{KNO}_3$  (grade biokemica) sera analysé immédiatement par électrode sélective (ISE).

#### **A1-5.3.3.1 Extraction à l'eau <sup>(1)</sup>**

Un volume minimale de 50 mL doit être recueilli suite à l'extraction afin de satisfaire les besoins minimales en surnageant de toutes les analyses prévues (anion =10 mL, COD =15 mL, pH = 0 mL,  $\text{Cu}^{2+}$  = 15 mL,  $\text{Cu}_{\text{total}}$ =10 mL). En théorie, pour un sol inorganique l'extraction peut être effectué selon un ratio de 1:2 jusqu'à 1:5. Pour s'assurer que l'on ait assez de surnageant pour toutes les analyses, tout en prévoyant un surplus, nous allons extraire à 80 mL d'eau Millipore avec un ratio 1:4.

1. Laver, préalablement, 18 bouteilles à centrifuger de 500 mL à l'acide.

2. Préparer une extraction par microcosme. Ainsi, pour une série, 3 extractions pour les microcosmes perturbés et 3 extractions pour les microcosmes non-perturbés sont préparées. Il y a 2 échantillons de sol par série, donc un total de 18 extractions.
3. Dans une bouteille à centrifuger de 500 mL, déposer 20 g de sol sec (le sol dans les pots est à 60% de sa CRC).
4. Ajouter, au poids un total de 80 mL d'eau Millipore (considérer le volume d'eau déjà inclus dans le sol).
5. Déposer les bouteilles à centrifuger horizontalement sur un agitateur mécanique, wrist action, fixé à la vitesse 10 (PE-32D) agiter pendant 2 heures.
6. Centrifuger à 8000 RMP ( $\approx 10\,000G$ ) avec le gros rotor pendant 15 minutes.
7. Transférer le surnageant dans des erlens de 125 mL lavés à l'acide.
8. Mesurer le pH dans chaque des erlens avec un électrode de pH préalablement calibré.
9. Le surnageant est ensuite transféré à l'aide d'une seringue de 30 mL en plastique et filtré à  $0,45\mu m$ . Séparer immédiatement les volumes requis pour chaque analyse individuelle. Les volumes nécessaires sont rapportés ci-dessus.
10. Rapportez-vous à la section appropriée à l'analyse pour les modes de conservation des échantillons.

**Tableau A1- 5 : Paramètres analysés sur l'extraction à l'eau des échantillons**

Contenant	Paramètre analyser	Volume (mL)	Labo
15 mL corning en plastique	Anions	10	Philip
15 mL corning en plastique	$\text{Cu}^{2+}$	10	CIRAIG
15 mL corning en plastique	$\text{Cu}_{\text{tot}}$	10	S. Sauvé
15 mL corning en plastique	COD	15	Carignan

**A1-5.3.3.2 Conservation des extraits pour l'analyse des anions**

1. Recueillir 10 mL de l'extrait à l'eau effectuer à la section 3.2.1. dans un tube en plastique de 15 mL.
2. Mettre au congélateur et conserver ainsi jusqu'à l'analyse.

**A1-5.3.3.3 Conservation des extraits en vue d'analyser le cuivre total soluble**

1. Prendre précisément 9,90 mL de l'extrait à l'eau effectuer précédemment. dans un tube de plastique de 15 mL préalablement lavé à l'acide.
2. Ajouter 0,1 mL de la solution de 0,05 M d'EDTA pour un échantillon de 10 mL (donne une solution de 0,5 mM d'EDTA).
3. Conserver à température pièce environ une semaine.
4. L'analyse des 2 jours d'extractions par série se fait la même journée soit le 2e mercredi.

NOTE : il faut considérer que la concentration de cuivre analysée ici n'est plus la même que celle de l'extraction, car nous avons dilué de 0,1 mL. Pour retrouver la concentration de l'extraction :

$$C_i = C_a \cdot 10\text{mL} / 9,90\text{mL}$$

Où

$C_i$  = concentration initiale de l'extraction

$C_a$  = concentration analysée

#### **A1-5.3.3.4 Conservation des extractions en vue d'analyser le carbone organique dissous**

1. Prendre 10 mL de l'extraction à l'eau effectuer précédemment dans un tube de plastique de 15 mL.
2. Ne rien ajouter et conserver à température pièce pour environ une semaine.
3. L'analyse des 2 jours d'extractions par série se fait la même journée soit le 2e mercredi.

#### **A1-5.3.3.5 Conservation des extractions en vue d'analyser l'ion $\text{Cu}^{2+}$**

1. Prendre précisément 9,50 mL de l'extraction à l'eau effectuer précédemment dans un tube de plastique de 15 mL.
2. Ajouter 0,50 mL de solution de  $\text{KNO}_3$  2M, la force ionique des échantillons pour l'analyse électrochimique du cuivre doit être constante à 0,1M de  $\text{KNO}_3$ .
3. Agiter et analyser la journée même.

NOTE : il faut considérer que la concentration de cuivre analysée ici n'est plus la même que celle de l'extraction, car nous avons dilué de 0,1 mL. Pour retrouver la concentration de l'extraction :

$$C_i = C_a \cdot 10 \text{ mL} / 9,50 \text{ mL}$$

Où

$C_i$  = concentration initiale de l'extraction

$C_a$  = concentration analysée

#### **A1-5.3.4 Analyse de l'ion $\text{Cu}^{2+}$ par électrode sélective au cuivre (2)**

On procède d'abord à la calibration de l'électrode de cuivre en utilisant une solution tampon mère faite de :

- $10^{-3}$  M en IDA (iminodiacetic acid disodium)
- $10^{-4}$  M en  $\text{Cu}^{2+}$  (provenant de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ )
- $6 \times 10^{-3}$  M de NaOH
- $2,5 \times 10^{-3}$  M Potassium acid phthalate
- $10^{-2}$  M en  $\text{KNO}_3$  grade biochemika

Cette solution se conserve bien. Elle peut être préparée en quantité de 1L.



**Tableau A1- 6 : Produit nécessaire à la préparation d'un litre de solution tampon mère**

Produit	Concentration (mol/L)	Masse Molaire (g/mol)	Masse (g)
Iminodiacetic acid disodium	$10^{-3}$	177,07	0,177
Cu (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	$10^{-4}$	187,56	0,019
NaOH	$6 \times 10^{-3}$	40,00	0,24
Potassium acid phthalate	$2,5 \times 10^{-3}$	204,22	0,51
KNO <sub>3</sub>	$10^{-2}$	147,01	1,47

On utilise la solution tampon mère en dix solutions étalons (10 mL dans des tubes de 15 mL), chacune étant acidifiée par quelques gouttes de HCl 5% afin d'obtenir une gamme de pH allant de 12 à 3 pour ces dix solutions. On laisse reposer ces solution étalons 24 heures.

Le  $pCu^{2+}$  de ces dix solutions est alors déduits à l'aide de l'équation :

$$pCu^{2+} = 0,587 * pH + 0,0799 * (pH)^2 - 0,00263 * (pH)^3 + 2,85 \quad (1)$$

Connaissant alors les  $pCu^{2+}$  des dix solutions étalons, on en mesure leur potentiels E (m/v), et on détermine les paramètres a et b de l'équation de la droite :

$$pCu^{2+} = a * E + b \quad (2)$$

où ;

E : les potentiels des solutions mesurées (mV)

a : La pente ( $mV^{-1}$ )

b : l'ordonnée à l'origine (mV)

Les potentiels des solutions inconnues sont alors mesurés, et leur  $pCu^{2+}$  est obtenu par l'équation (2). Chaque solution prend environ 20 minutes avec agitation pour se stabiliser. La mesure est alors prise après ce temps, agitation coupée.

Les étalons sont analysés une fois chacun, les échantillons sont analysés en triplicatas (1 par microcosme). Donc 10 étalons plus 18 échantillons, on aura 28 mesures à faire. Une durée d'environ 10 heures de travail.

### **A1-5.3.5 Analyse de l'activité enzymatique**

#### **A1-5.3.5.1 Veille du jour 1**

1. Après avoir prélevé les sols nécessaires pour les extractions à l'eau, prendre la masse des pots contenant les échantillons à 60% de leur CRC et mettre au four à 60°C pendant 24 hres (sans couvercle).

#### **A1-5.3.5.2 Jour 1**

1. Retirer du four à 60°C les microcosmes perturbé et réhumidifier en ajoutant l'eau nécessaire pour obtenir la masse mesure au point 2 de la section précédente.
2. Suivre les protocoles PE-66-G et PE-66-H pour l'analyse enzymatique de la protéase, la glucosidase et l'arylsulfatase.

#### **A1-5.3.5.3 Au jour 2, 3 et 4**

1. Suivre les protocoles PE-66-G et PE-66-H pour l'analyse enzymatique de la protéase, la glucosidase et l'arylsulfatase.

#### **A1-5.4 SANTÉ ET SÉCURITÉ**

Le port du sarrau et des lunettes de sécurité est obligatoire. Le port de gants de caoutchouc et d'une visière protectrice est nécessaire lors des manipulations impliquant le bain d'acide (lavage des pyrex).

#### **A1-5.5 RÉFÉRENCE(S)**

- (1) SAUVÉ, S., Extraction d'une solution de sol pour détermination des métaux dissous, Procédures expérimentales : Laboratoire de chimie environnementale, 2003, p.25-26.
- (2) SAUVÉ, S., Détermination du cuivre libre par électrode à ion spécifique, Procédures expérimentales : Laboratoire de chimie environnementale, 2003, p.34-35.

#### **A1-5.6 RECOMMANDATION(S)**

Préparer à l'avance les solutions lorsqu'il est possible de le faire. Les manipulations sont longues et demandent une bonne préparation.


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-G	Nombres de pages : 6	
Version : 4	Date : 23 novembre.2004	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-6 : Mesure de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de l'arylsulfatase basée sur la détermination de la production de *p*-nitrophénol

Mots clés :  $\beta$ -glucosidase, arylsulfatase, enzymes, activité, processus biochimiques

### **A1-6.1 OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol. Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, de l'azote et du soufre. Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose chacun des protocoles proposés est la mesure du potentiel d'activité enzymatique. C'est à dire, que l'on va introduire dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé et l'on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique.

La  $\beta$ -glucosidase est l'enzyme limitant la dégradation microbienne de la cellulose au glucose. La  $\beta$ -glucosidase a été détectée chez les microorganismes, les cellules de plantes et d'animaux. Elle est inactivée à des températures dépassant 70°C et montre une corrélation importante avec le contenu en matière organique.

### **A1-6.2 Matériels**

- Incubator shaker (New Brunswick scientific, Innova 4000, U.S.A);
- pH-mètre (Accumet, modèle 25, pH/ionmeter);
- Balance précision 0,0001 (Mettler toledo, AB204, Switzerland);
- Erlemeyers de 100 mL
- 3 ballons de 1 litre
- 2 ballons de 25 mL
- 5 béchers de 25 mL

- Pipette pasteur
- Micropipette P5000, P1000
- Pipette graduée de 25mL
- Pipette graduée de 10 mL
- Cylindre gradué de 1L
- Bouteille ambrée de 1L
- Seringue graduée de 30 mL
- Filtre millipore non stériles de 0,45 $\mu$ m
- Disodium *p*-nitrophenyl-  $\beta$ -D glucopiranoside (-20°C, dessicateur. Manipuler avec ventilation et sensible à la lumière)
- potassium-*p*-nitrophenylsulfate (-20°C, dessicateur. Manipuler avec ventilation et sensible à la lumière)
- NaOH
- *p*-nitrophenol

### **A1-6.3 Préparation des solutions**

#### **A1-6.3.1 NaOH (1M)**

- Peser 40 g de NaOH dans une cupule de plastique.

- Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

**A1-6.3.2 Solution de Chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$  (0,5M) : (même que pour sulfatase)**

1. Dans un ballon de 500 mL, peser 36,74g de  $\text{CaCl}_2$  dihydrate
2. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée
3. Attention aux bulles lors de l'ajoute de l'eau, il y a du chlore qui se libère, alors faire le mélange sous une hotte

**A1-6.3.3 Solution d'hydroxyde de sodium (0.5M) : (même que pour sulfatase)**

1. Peser 20 g de NaOH dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L et ajouter de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

**A1-6.3.4 Solution standard stock (1 mg *p*-nitrophenol/mL) : (même que pour sulfatase)**

1. Peser 1g de *p*-nitrophenol dans une cupule de plastique.
2. Transvider le contenu de la cupule dans un ballon de 1L
3. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
4. Garder cette solution à 4°C dans un contenant ambré.

**A1-6.3.5 Standard de travail pour une courbe de calibration ( $20 \mu\text{g p-nitrophenol mL}^{-1}$ ) :**

1. Pipeter 1 mL avec une micropipette P1000 de la solution stock dans un ballon de 50 mL
2. Ajuster le volume au trait de jauge avec de l'eau distillée.
3. Transvider dans un bécher

**A1-6.3.6 Standard de calibration :**

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des erlenmeyers de 50 mL.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000.
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M). Il est important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le NaOH
4. Ajouter 4 mL avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres  $0,45 \mu\text{m}$ .
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{g}$  de p-nitrophenol par mL.

**A1-6.3.7 Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (25mM) :**



1. Peser 0,754 g de disodium *p*-nitrophényl- $\beta$ -D glucopiranoside dans un ballon de 100mL.
2. Diluer dans de l'eau distillée et ajuster le volume au trait de jauge à 50 mL avec de l'eau.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température.

**A1-6.3.8      Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (0.02M) :**

1. Peser 515.00 mg de potassium-*p*-nitrophenylsulfate dans un ballon de 100 mL.
2. Diluer dans de l'eau distillé et ajuster le volume au trait de jauge à 25 mL avec l'eau.
3. Préparer la solution le jour même.

ATTENTION : le substrat est sensible à la lumière et à la température. Couvrir.

**A1-6.4          Méthode**

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la phosphatase, 3) traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs. La méthode est la même pour l'arylsulfate. Il suffit d'utiliser le bon substrat (potassium-*p*-nitrophenylsulfate).

**A1-6.4.1 Préparation du sol et incubation avec substrat**

1. Peser  $1,00\text{g} \pm 0,03$  de sol humide dans 3 erlenmeyers de 100 mL.
2. Avec une P5000, ajouter 4mL du d'eau distillé et 1 mL avec une P1000 de la solution de substrat correspondante dans deux des 3 erlenmeyers (échantillons).
3. Avec une P5000, pipeter seulement 4 mL de d'eau distillée correspondant dans l'autre erlenmeyer (contrôle).
4. Agiter brièvement et incubé 1h à 37°C dans l'incubateur.

**A1-6.4.2 Préparation du filtrat après incubation**

1. Avec une P1000, ajouter 1 mL de chlorure de calcium dans les 3 erlenmeyers.  
Attention il est très important d'ajouter le  $\text{CaCl}_2$  avant le NaOH.
2. Avec une P5000, ajouter 4 mL de NaOH (0,5M) dans les 3 erlenmeyers.
3. Avec une P1000, ajouter 1 mL de solution de substrat correspondante dans les contrôles.
4. À l'aide d'une dispensette de 100mL, ajouter 20 mL d'eau Mili-Q dans les 3 erlenmeyers
5. Agiter les erlenmeyers, s'assurer que le pH est au dessus de 10.
6. À l'aide d'une seringue graduée de 5 mL, prélever environ 3 mL du surnageant.

7. Ajouter un filtre millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  non stérile au bout de la seringue et filtrer et les échantillons le contrôle immédiatement dans des cuvettes à lecture UV de 25 mL.

#### **A1-6.4.3      Analyses photométrique du filtrat**

Mesurer l'extinction à 420 nm avec un spectrophotomètre contre le blanc.

#### **A1-6.4.4      Courbe de calibration**

1. Pipeter avec la pipette P5000 (blanc) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL du standard de travail dans des éprouvettes jetables.
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec de l'eau distillée en pipetant dans le même ordre qu'au point précédent 5, 4, 3, 2, 1 et 0 mL avec une P5000 dans les éprouvettes jetables
3. Ajouter 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0,5M).
4. Ajouter 4 ml avec une P5000 de solution d'hydroxyde de sodium (0,5M).
5. Filtrer sur des filtres.
6. Les standards de calibration contiennent 0, 2, 4, 6, 8 et 10  $\mu\text{g}$  de *p*-nitrophenol par mL de solution

#### **A1-6.5      Calculs**

Calculer les concentrations of *p*-nitrophenol (*p*NP) à partir des courbes de calibration.

$$\frac{(S - C) \times V}{m \times \%ms} = \mu\text{g} \cdot pNP \cdot g_{sol-sec}^{-1} h^{-1}$$

S	valeur moyenne des échantillons ( $\mu\text{g } p\text{NP}$ )
C	valeur moyenne des contrôles ( $\mu\text{g } p\text{NP}$ )
V	volume de solution ajouté à l'échantillon
m	masse de sol humide de l'échantillon
ms	taux de matière sèche du sol (ms = 1-taux d'humidité du sol).

#### **A1-6.6      Notes**

Le substrat est sensible à la chaleur et à la lumière, les flacons doivent être recouverts d'aluminium.

Mesurer l'extinction dans les 6 premières heures.

La courbe de calibration est linéaire jusqu'à 120  $\mu\text{g } p\text{-nitrophenol}$

L'ajustement du pH devrait se faire à 37°C puisque c'est la T° d'incubation

Utiliser plus ou moins de sol si l'activité sort de la courbe de calibration, ou est trop faible.

Le  $\text{CaCl}_2$  est ajouté afin d'éviter l'interférence que créent les substances humiques qui se dissolvent. Il prévient aussi la dispersion de l'argile. Un précipité blanchâtre se forme lorsque le NaOH est ajouté au  $\text{CaCl}_2$ .


**CIRAIG**

Centre Interuniversitaire de Référence sur  
l'Analyse, l'interprétation et la Gestion du cycle  
de vie des produits, procédés et services

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Protocole : PE-66-H	Nombres de pages : 5	
Version : 4	Date : 23 novembre.2004	
Auteur(s): <u>Marylène Dussault</u> _____		
Approuvé par :	Signatures :	Date :
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

A1-7 : Mesure de l'activité de la protéase dans les sols	
Mots clés : Protéase, activité enzymatique, enzyme	

### **A1-7.1            OBJECTIF**

Ce protocole a pour objectif de mesurer le potentiel d'activité enzymatique dans un sol.

Les enzymes testés sont des représentants des cycles du carbone, azote et soufre.

Puisqu'il est très difficile d'extraire et de mesurer les enzymes contenus dans les sols, le principe sur lequel repose chacun des protocoles proposés est la mesure du potentiel d'activité enzymatique. C'est à dire, que l'on va introduire dans un échantillon de sol un substrat ciblé par l'enzyme testé et l'on mesure après une période d'incubation les produits de la transformation enzymatique.

L'activité de la protéase a été détectée dans des microorganismes, des plantes des animaux. Elle est responsable de l'hydrolyse des protéines en polypeptides et des oligopeptides en acides aminés. Dans le sol, la protéase est présente dans des cellules actives, des cellules mortes, en tant qu'enzyme libre ou absorbée à la matière organique, inorganique et organo-minérale.

### **A1-7.2            Matériels**

- Un agitateur rotatif
- NaOH 1 M
- 3 Ballons de 1 litre
- 2 ballon de 25 mL
- 1 ballon de 500 mL
- 1 bécher de 500 mL

- 1 bécher de 250 mL
- 1 ballon de 10 mL
- 58 erlenmeyers de 50 mL
- Caséine
- $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA)
- carbonate de sodium
- Copper(II)sulfate pentahydrate
- Sodium potassium tartate ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- Folin Ciocalteu's phenol reagent
- Tyrosine (frais et sec)

### **A1-7.3 Préparation des solutions**

#### **A1-7.3.1 Solution de substrat pour une analyse et une courbe de calibration (2% w/v) :**

1. Dans un ballon de 500 mL, peser 10g de caseine (sodium-salt, Sigma C-2649) dans un ballon suspendre dans l'eau distillée, et ajuster le volume avec l'eau chaude.
2. Mélanger la suspension à 50°C jusqu'à ce que la caséine soit dissoute.
3. Préparer, ce réactif la journée même.

**A1-7.3.2 Solution d'acide trichloroacétique (TCA, 0,92M) :**

1. Peser 150 g de  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA) dans un ballon de 1L
2. Dissoudre et diluer jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

**A1-7.3.3 Réactif A, protéase :**

1. Peser 50 g de carbonate de sodium (water-free) dans un ballon de 1L
2. Ajouter 6mL de NaOH 1M,
3. Dissoudre dans 600 mL d'eau distillée, ajuster le volume.
4. Garder la solution à 4°C au maximum 3 semaines.

**A1-7.3.4 Réactif B, protéase :**

1. Peser 0,125 g de copper(II)sulfate pentahydrate (ou 0,04 g anhydre) dans un ballon de 25 mL
2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
3. Garder à 4°C au maximum 3 semaines.

**A1-7.3.5 Réactif C, protéase :**

1. Peser 0,25 g de sodium potassium tartate ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dans un ballon de 25 mL.
2. Dissoudre et diluer avec de l'eau distillée.
3. Garder à 4°C pour quelques jours.



**A1-7.3.6 Réactif alcali pour une analyse et une courbe de calibration (solution de travail) :**

1. Mélanger 250 mL de réactif A, 5 mL de réactif B et 5 mL de réactif C dans un bécher de 250mL.
2. Préparer cette solution le jour même.

**A1-7.3.7 Réactif de phénol Folin-Ciocalteu pour une analyse et une courbe de calibration :**

Pipeter 100 mL de Folin Ciocalteu's phenol reagent (Merck, 9001 ou Sigma F-9252) dans un ballon de 1L et diluer avec eau distillée.

**A1-7.3.8 Solution standard stock pour une courbe ( 500 µg de tyrosine/mL):**

1. Peser 5 mg de tyrosine dans un ballon de 10 mL et dissoudre dans l'eau distillée.
2. Si nécessaire, chauffer pour dissolution complète.
3. Ajuster au trait de jauge avec du tampon tris.
4. Garder la solution à 4°C pour quelques jours seulement dans une bouteille ambrée.

**A1-7.3.9 Standard de calibration :**

1. Pipeter 0, 0.2, 0.5 et 1 mL de la solution stock dans 4 erlens de 50 mL,
2. Ajuster les volumes à 5 mL avec l'eau distillée, (ajouter dans le même ordre que précédemment : 5, 4.8, 4.5, 4 mL)

3. Ajouter 5 mL de solution de substrat et 5mL de solution TCA.
4. Les standards de calibration contiennent 0 (blanc), 100, 250, 500 µg de tyrosine.

#### **A1-7.4 Méthode**

Les mesures sont effectuées en 4 étapes : 1) Il faut préparer le sol avec le substrat et l'incuber, 2) Préparation du filtrat qui contient le produit de l'activité de la protéase, 3) Traiter le filtrat avec un réactif coloré pour mesure photométrique, 4) Préparation de la courbe de calibration pour effectuer les calculs.

##### **A1-7.4.1 Préparation du sol et incubation avec substrat**

1. Peser 1g de sol humide dans trois erlenmeyers de 50 mL (2 échantillons et 1 contrôles).
2. Ajouter 5 mL de solution substrat et 5 mL d'eau distillée dans 2 erlenmeyers (échantillons).
3. Pipeter seulement 5mL d'eau dans le dernier (contrôle).
4. Agiter les flacons brièvement, sceller avec des « rubber stoppers » et incuber pour 2h à 50°C sur un agitateur rotatif.

##### **A1-7.4.2 Préparation du filtrat après incubation**

1. Pipeter 5 mL (avec une P5000) de substrat dans le contrôle,
2. Mélanger brièvement
3. Ajouter 5 mL (avec une P5000) de TCA dans les 3 erlenmeyers.

4. Agiter brièvement, prélever 4 mL avec une seringue puis installer un filtre 0,45  $\mu\text{m}$  au bout de la seringue et filtrer immédiatement.

#### **A1-7.4.3      Analyses photométrique du filtrat**

1. Pipeter 2,5 mL (avec une P5000) de filtrat dans une éprouvette jetable.
2. Ajouter 3,75 mL (avec une P5000) de réactif alcali dans les éprouvettes jettables.
3. Bien mélanger
4. Ajouter 2,5 mL (avec une P5000) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
5. Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
6. Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
7. Dans les prochaines 90 minutes, mesurer l'extinction (absorbance) des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 700 nm.

#### **A1-7.4.4      Courbe de calibration**

1. Filtrer les standards de calibration
2. Pipeter 2,5 mL (avec une P5000) de filtrat dans une éprouvette jetable.
3. Ajouter 3,75 mL (avec une P10 mL) de réactif alcali dans les éprouvettes jettables.

4. Bien mélanger
5. Ajouter 2,5 mL ( avec une P5000) de Folin Ciocalteu's phenol reagent, mélanger encore.
6. Si un précipité est formé après 1h, filtrer ou centrifuger la solution.
7. Laisser reposer 90 min à la température de la pièce pour le développement de la couleur.
8. Dans les prochaines 90 min mesurer l'extinction des standards, des échantillons et des contrôles contre le blanc à 700 nm.

#### **A1-7.5          Calculs**

L'activité de la protéase est exprimée en µg de tyrosine équivalent (tyr) par gramme de matière sèche et temps d'incubation. L'équivalent tyrosine est calculé à partir de la courbe de calibration.

$$\frac{(S-C) \cdot 100}{\% \text{ sol sec}} = \mu\text{g tyr} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sol sec} \cdot 2\text{h}^{-1}$$

S                      Valeur moyenne des échantillons (µg tyr)

C                      Control (µg tyr)

$100 \cdot \%^{-1} \text{ sol sec}$               Facteur pour le sol sec.

**A1-7.6      Note :**

- Il est possible de garder les filtrats à 4°C pendant 5h
- Si la concentration en tyrosine dépasse la courbe de calibration, réduire le temps d'incubation à 1h.
- Dans les contrôles, la caséine (le substrat doit être ajouté immédiatement avant le TCA à la fin de l'incubation parce que la précipitation n'est pas complète si le substrat est ajouté après la solution acide.

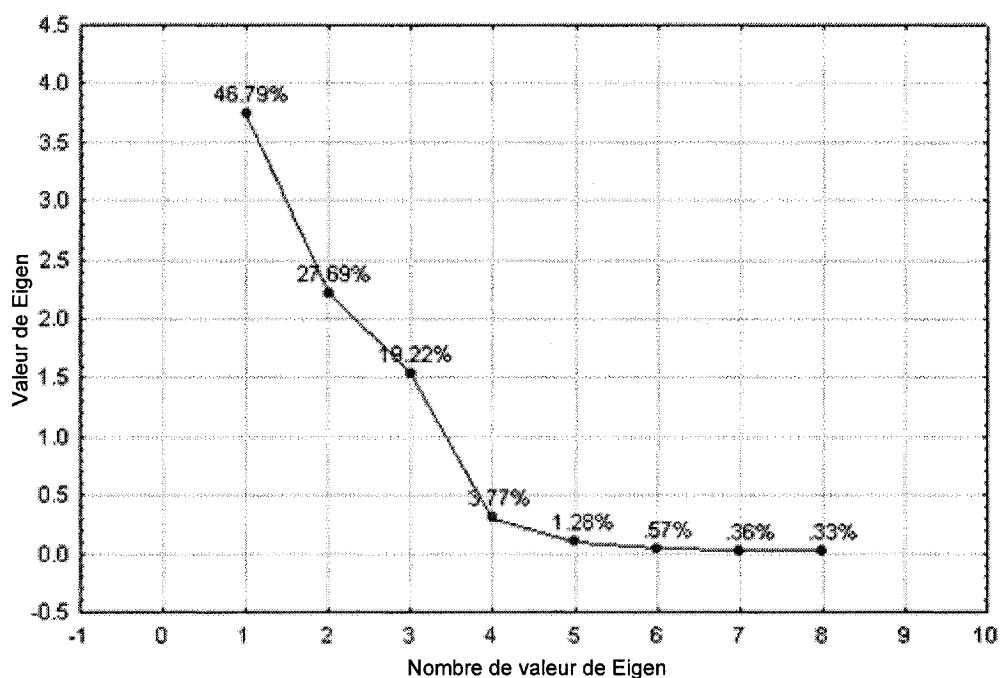
**A1-7.7      Références**

Ladd JN, Butler JHA (1972) Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. Soil Biology and Biochemistry, 4: 19-39.

## Annexe 2. Analyses statistiques

### A2-1 : Analyse des composantes principales de l'activité enzymatique seule

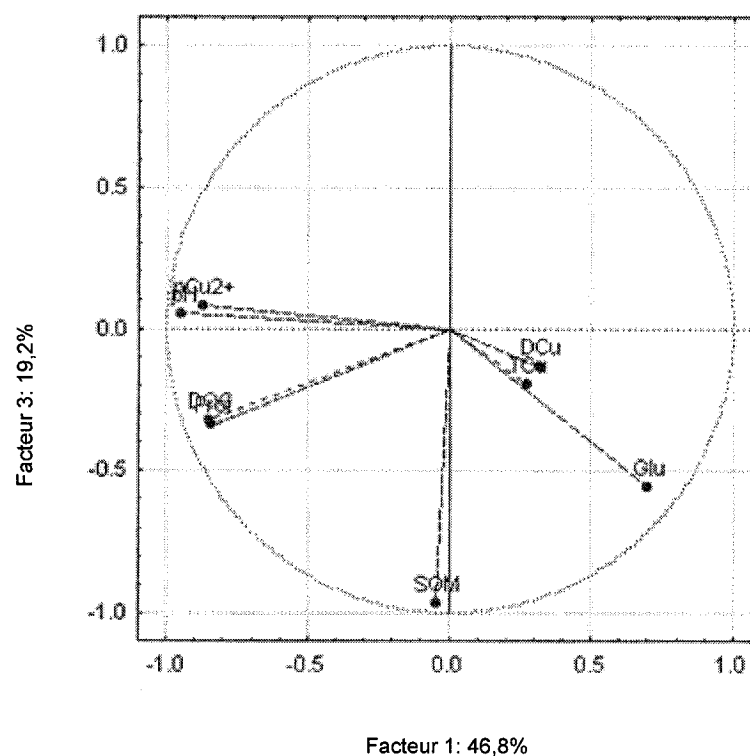
Les résultats du PCA effectués sur l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase et les propriétés chimiques, et qui n'ont pas été présentés dans les chapitres précédents, sont présentés dans cette section. Les résultats ont été obtenus en utilisant l'aire sous les courbes de l'activité des enzymes des sols non-perturbés.



**Figure A2- 1 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA de l'activité enzymatique et des propriétés chimiques**

**Tableau A2- 1 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales, avec les résultats de l'activité enzymatique des sols non-perturbés.**

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Glu	0,697207	0,425091	-0,555315
Prot	-0,838971	0,052127	-0,341596
TCu	0,275126	-0,919982	-0,197488
SOM	-0,045390	0,189565	-0,969906
pCu2+	-0,873514	0,330562	0,079206
DCu	0,321509	-0,903688	-0,135966
pH	-0,945316	-0,285231	0,053438
DOC	-0,845753	-0,376862	-0,324335



**Figure A2- 2 : Plan factoriel du PCA (1,3) de l'activité enzymatique et des propriétés chimiques**

## A2-2 : ANOVA des RSSI

### A2-2.1 $\beta$ -glucosidase

**Tableau A2- 2 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la  $\beta$ -glucosidase**

	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
log-RSSI_G	17,58906	0,237727	18,25016	11	0,075955

**Tableau A2- 3 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la  $\beta$ -glucosidase**

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	220,5964	1	220,5964	112422,6	0,000000
SOM	0,2430	2	0,1215	61,9	0,000000
pH	0,0040	1	0,0040	2,0	0,160663
Cu	0,0077	1	0,0077	3,9	0,052645
SOM*pH	0,0026	2	0,0013	0,7	0,516338
SOM*C <sub>u</sub>	0,0145	2	0,0073	3,7	0,030411
pH*C <sub>u</sub>	0,0020	1	0,0020	1,0	0,313295
SOM*pH*C <sub>u</sub>	0,0832	2	0,0416	21,2	0,000000
Error	0,1177	60	0,0020		

### A2-2.1 Protéase

**Tableau A2- 4 : Test d'homogénéité de la variance du RSSI de la protéase**

	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
log-RSSI pro	7,771007	0,179757	6,855947	11	0,810626



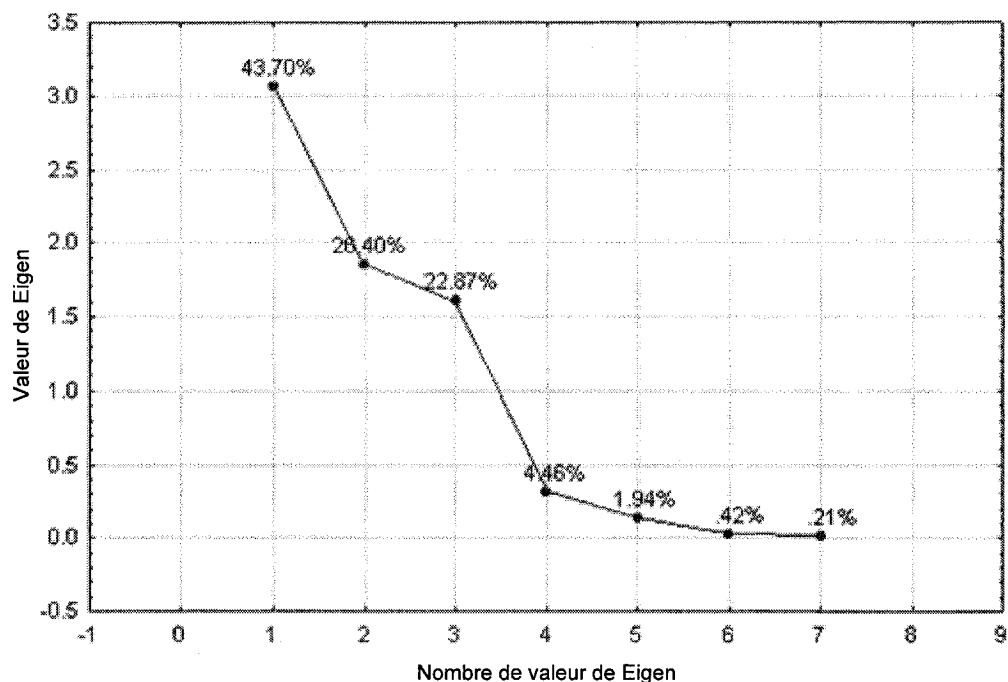
**Tableau A2- 5 : Résultats de l'ANOVA factorielle sur les RSSI de la protéase**

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	227,6407	1	227,6407	22611,42	0,000000
SOM	0,7034	2	0,3517	34,93	0,000000
pH	0,2798	1	0,2798	27,80	0,000003
Cu	2,2706	1	2,2706	225,54	0,000000
SOM*pH	0,0580	2	0,0290	2,88	0,065933
SOM*C <sub>u</sub>	0,0044	2	0,0022	0,22	0,804055
pH*C <sub>u</sub>	0,1814	1	0,1814	18,02	0,000100
SOM*pH*C <sub>u</sub>	0,0853	2	0,0427	4,24	0,020184
Error	0,4832	48	0,0101		

### **A2-3 : Analyse des composantes principales des RSSI de l'activité enzymatique**

Les résultats du PCA effectués sur les RSSI de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et de la protéase et les propriétés chimiques, n'ayant pas été présentés dans les chapitres précédents, sont présentés dans cette section.

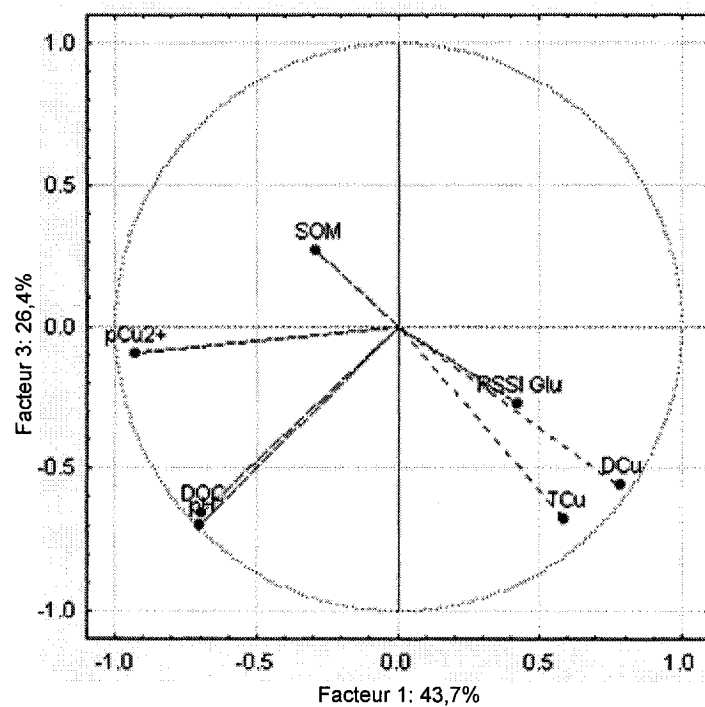
### A2-3.1 $\beta$ -Glucosidase



**Figure A2- 3 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA des RSSI de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et des propriétés chimiques**

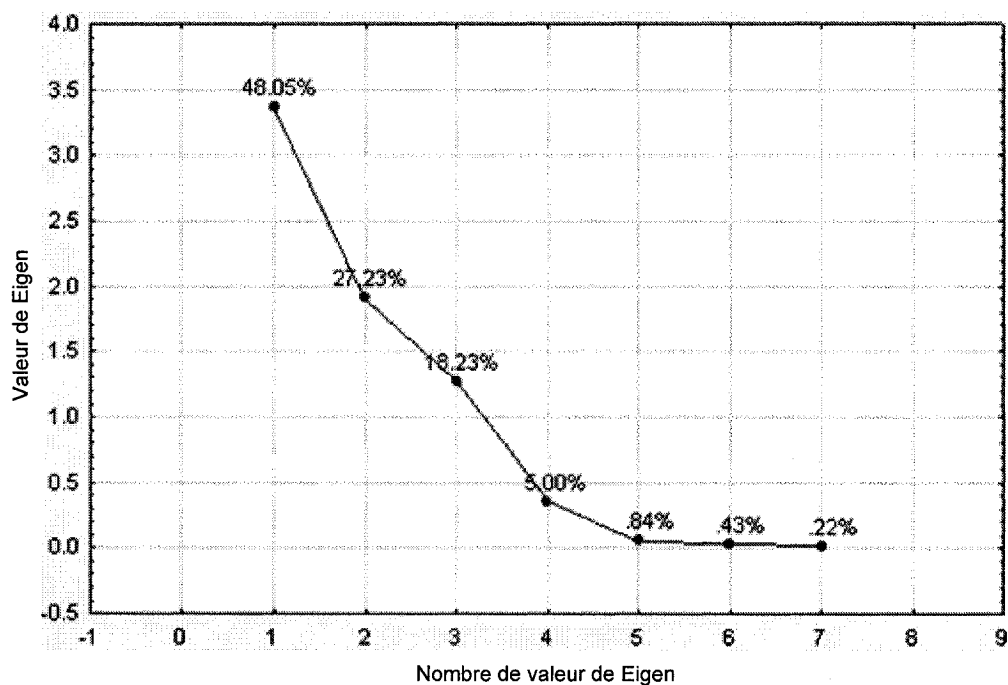
**Tableau A2- 6 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales avec les résultats du RSSI de la  $\beta$ -glucosidase.**

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
RSSI Glu	0,423835	-0,272714	0,760570
TCu	0,588784	-0,679181	-0,386639
SOM	-0,289814	0,266867	-0,840938
pCu2+	-0,928792	-0,098237	0,249573
DCu	0,785353	-0,560872	-0,228882
pH	-0,699158	-0,698635	0,097190
DOC	-0,692921	-0,654622	-0,203602



**Figure A2- 4 : Plan factoriel du PCA (1,2) des RSSI de l'activité de la  $\beta$ -glucosidase et des propriétés chimiques**

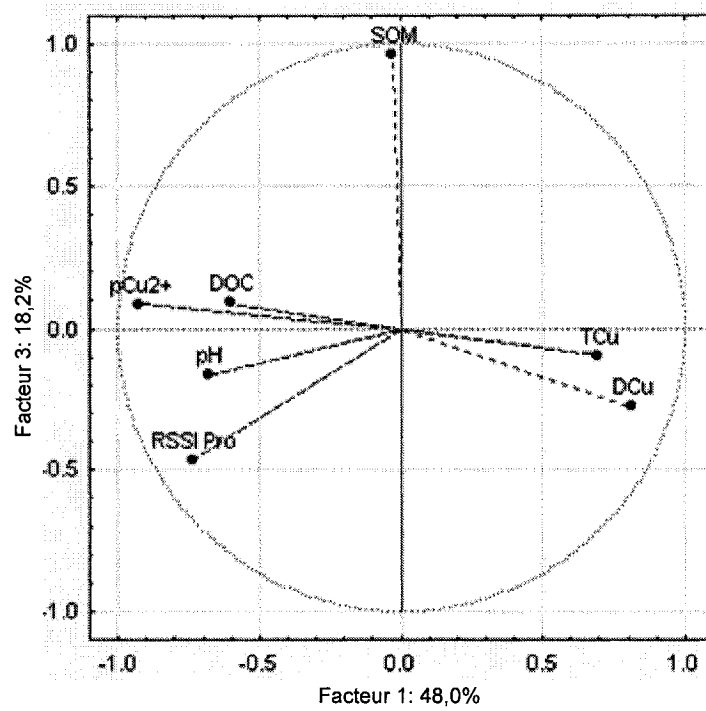
### A2-3.2 Protéase



**Figure A2- 5 : Valeur de Eigen de la matrice de corrélations du PCA des RSSI de l'activité de la protéase et des propriétés chimiques.**

**Tableau A2- 7 : Facteur de corrélation des variables par rapport aux composantes principales avec les résultats du RSSI de la protéase.**

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
RSSI Pro	-0,734711	0,274772	-0,463543
TCu	0,694552	-0,694298	-0,095801
SOM	-0,025456	-0,110197	0,965631
pCu2+	-0,925544	-0,150300	0,086912
DCu	0,812816	-0,485833	-0,277226
pH	-0,679552	-0,704406	-0,163863
DOC	-0,601231	-0,762439	0,091528



**Figure A2- 6 : Plan factoriel du PCA (1,3) des RSSI de l'activité de la protéase et des propriétés chimiques**

### **Annexe 3. Résultats bruts**

Les résultats bruts obtenus au cours de l'étude ont été regroupés dans un fichier Excel qui a été gravé sur le CD ci-joint. Le lecteur est invité à naviguer à travers le classeur. Le classeur comprend 4 tableaux. Les informations retrouvées dans chacun des tableaux sont rapportées au tableau A3-1.

**Tableau A3- 1 : Liste des tableaux regroupés sur le disque**

Feuille	Information reliée aux enzymes
Tableau A3-2	RSSI de l'activité de la protéase
Tableau A3-3	RSSI de l'activité de la $\beta$ -glucosidase
Tableau A3-4	Activité enzymatique des sols non-perturbés
Tableau A3-5	Activité enzymatique des sols perturbés

## Annexe 4. Courbes d'activité enzymatique

Pour tous les graphiques de la section A4-1, A4-2 et A4-3 la même légende s'applique : les courbes pleines correspondent aux sols non-perturbés et les courbes discontinues représentent les sols perturbés thermiquement (17h, 60°C). Les triangles blancs représentent les sols non-contaminés, les losanges noirs représentent les sols contaminés à 250 mg de Cu/kg de sol sec et les  $\times$  représentent des sols contaminés à 750 mg de Cu/kg de sol sec.

### A4-1 Activité de la $\beta$ -Glucosidase

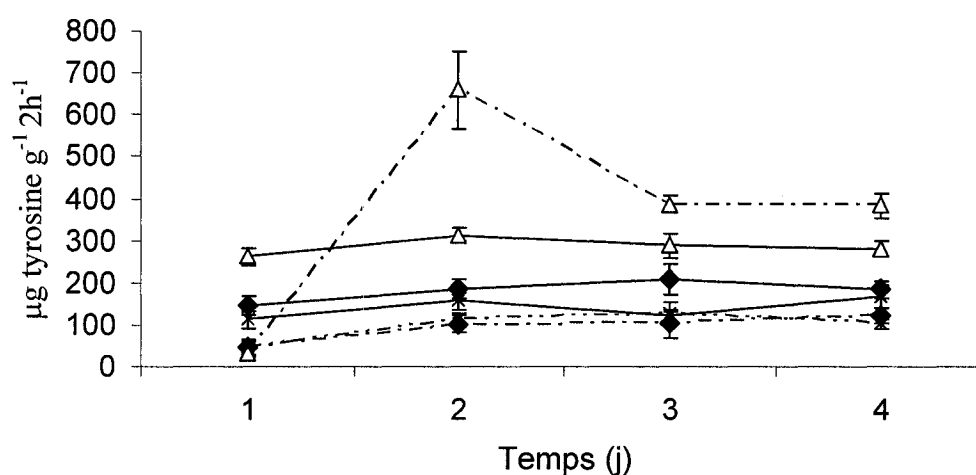


Figure A4- 1 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *La* dans le temps.

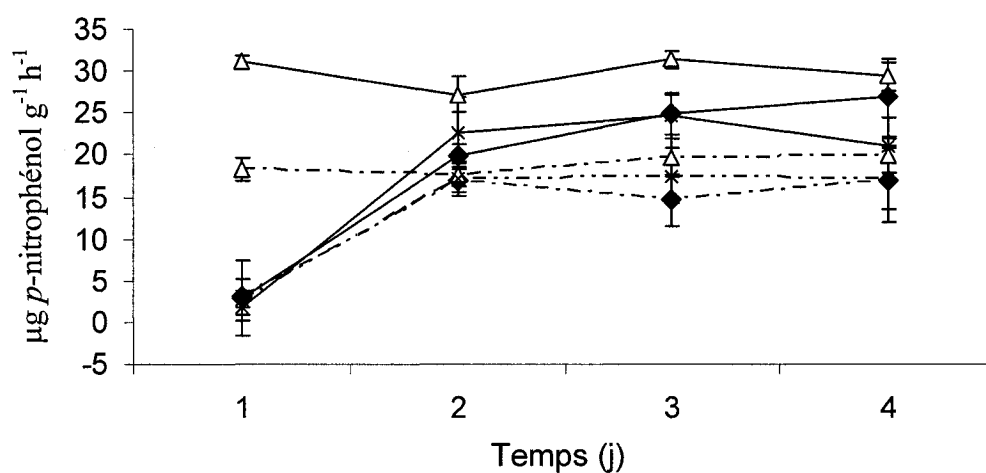


Figure A4- 2 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *Ln* dans le temps.

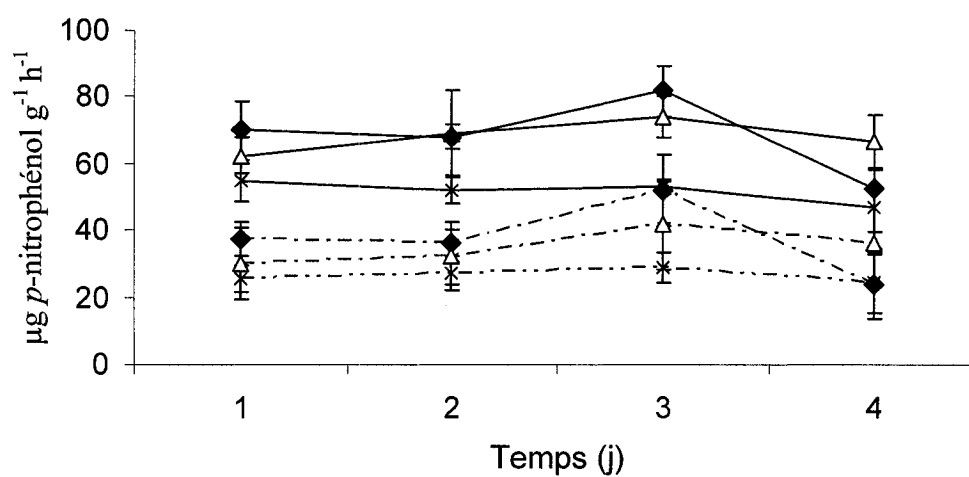


Figure A4- 3 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *Ma* dans le temps.



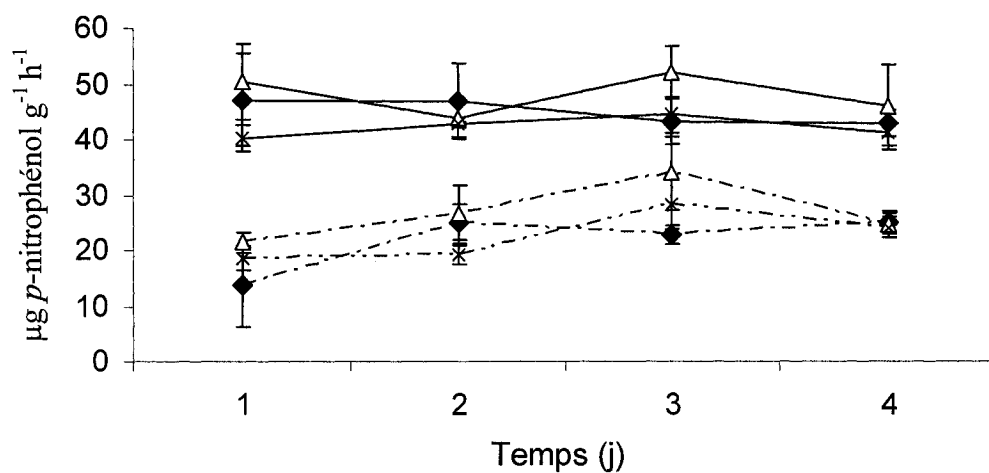


Figure A4- 4 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *Mn* dans le temps.

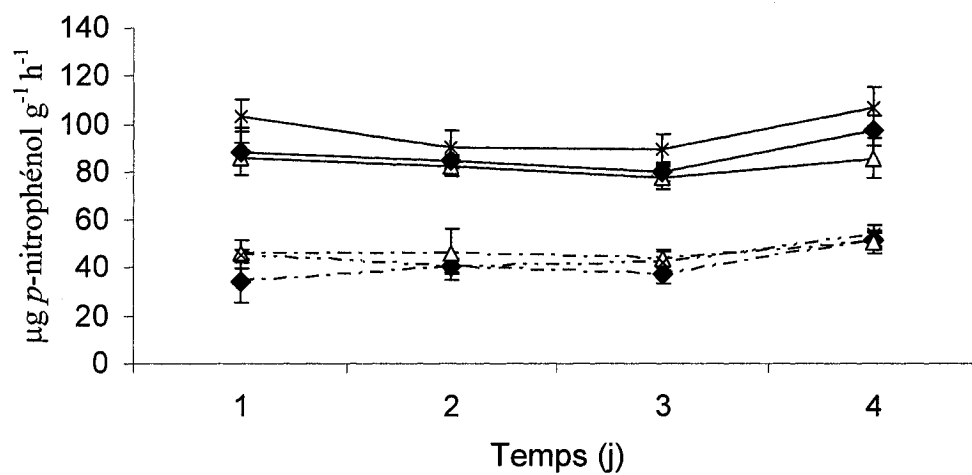


Figure A4- 5 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *Ha* dans le temps.

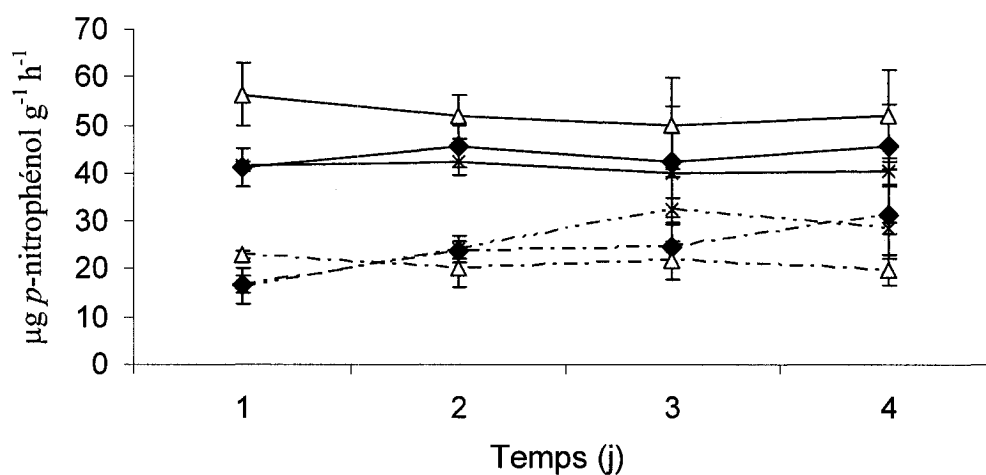


Figure A4- 6 : Courbes d'activité de la  $\beta$ -Glucosidase du sol *Hn* dans le temps.

#### A4-2 Activité de la protéase

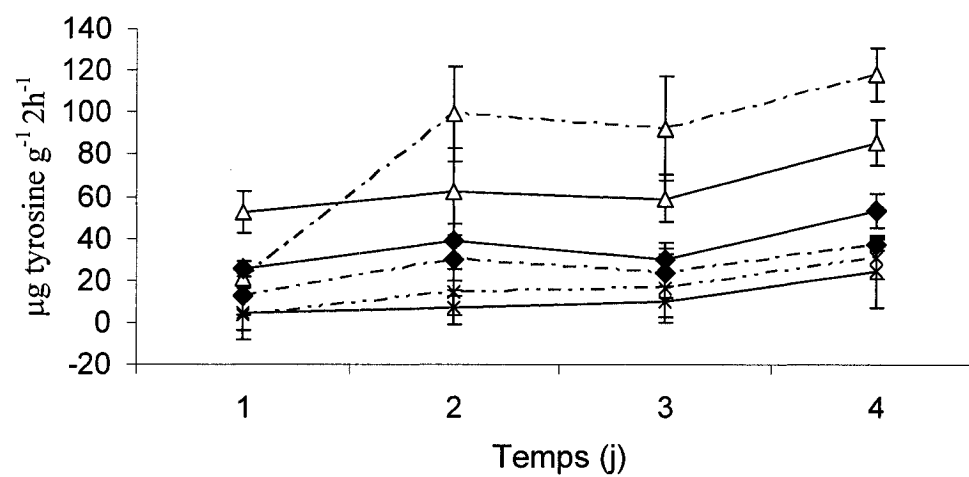


Figure A4- 7 : Courbes d'activité de la protéase du sol *La* dans le temps.

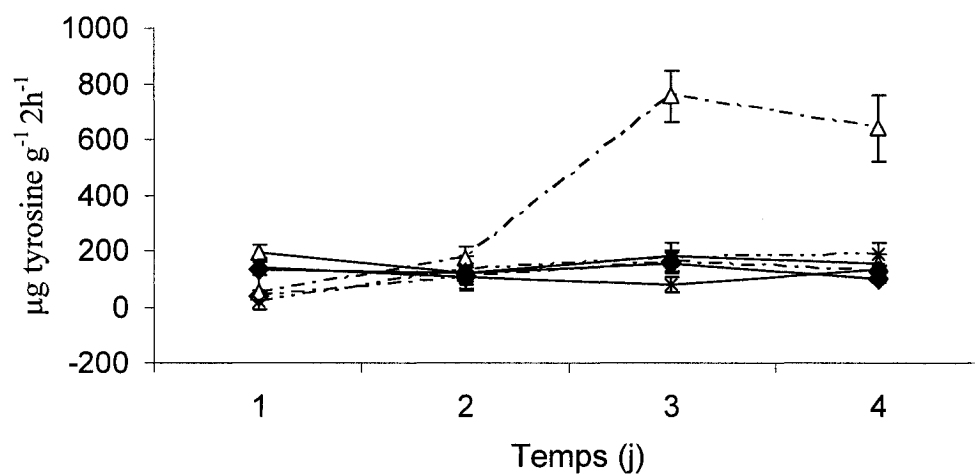


Figure A4- 8 : Courbes d'activité de la protéase du sol *Ln* dans le temps.

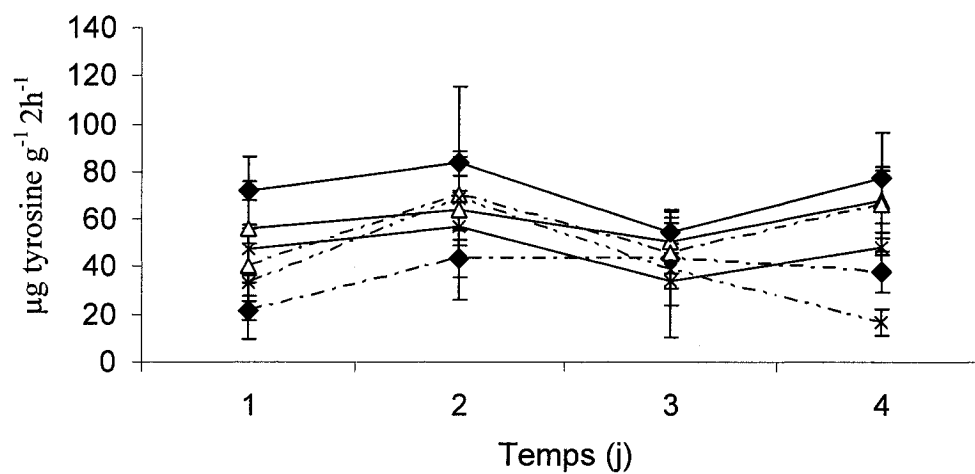


Figure A4- 9 : Courbes d'activité de la protéase du sol *Ma* dans le temps.

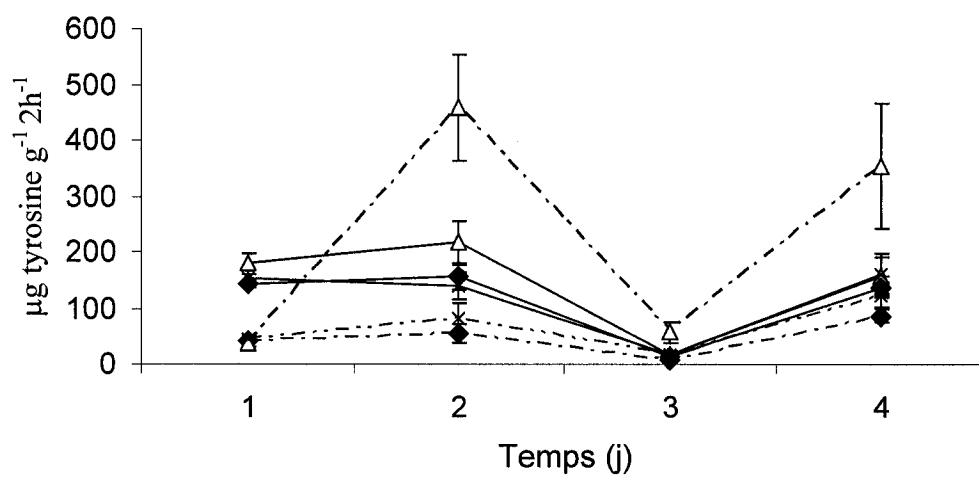


Figure A4- 10 : Courbes d'activité de la protéase du sol *Mn* dans le temps.

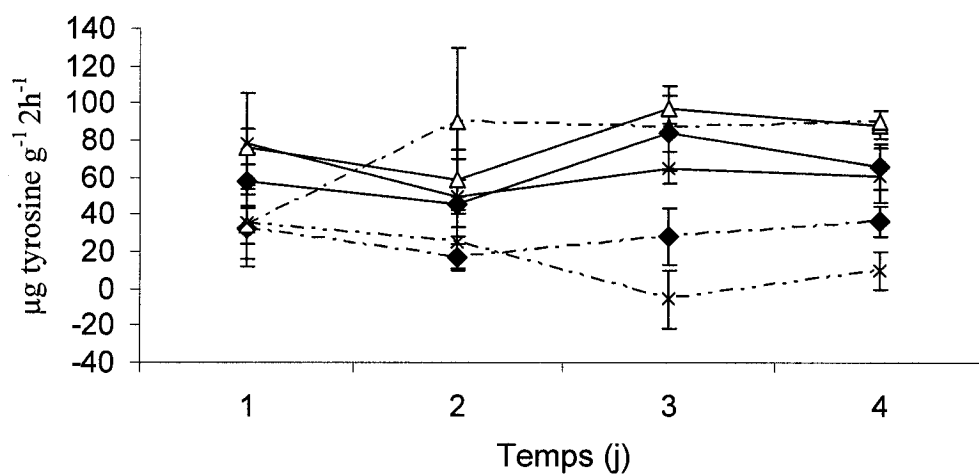


Figure A4- 11 : Courbes d'activité de la protéase du sol *Ha* dans le temps.

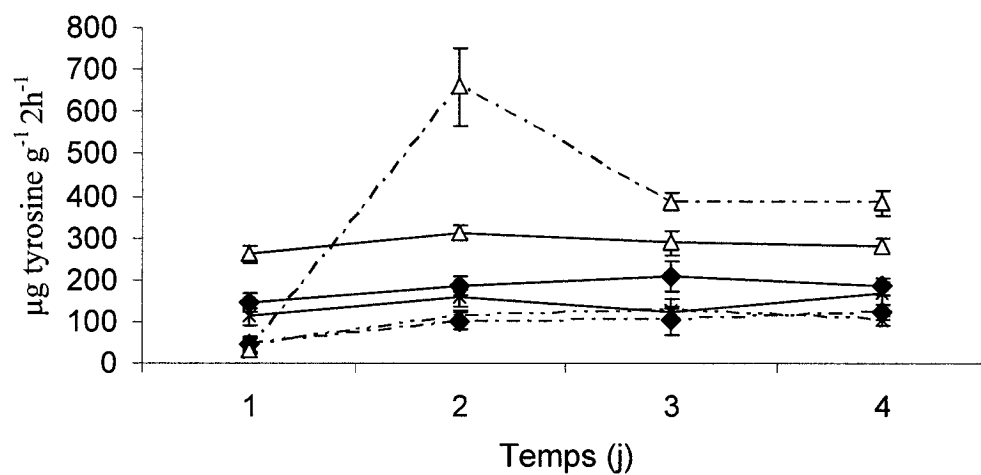


Figure A4- 12 : Courbes d'activité de la protéase du sol *Hn* dans le temps.

#### A4-2 Activité de l'arylsulfatase

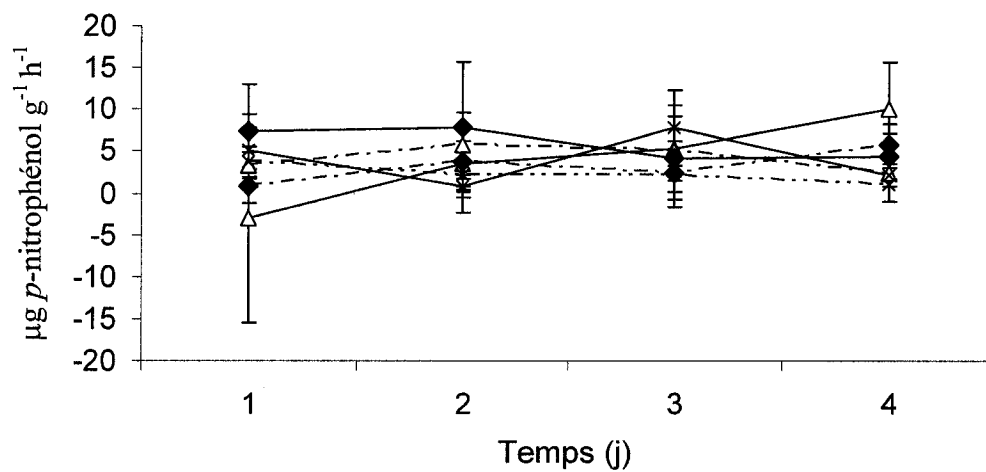


Figure A4- 13 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol *Ln* dans le temps.

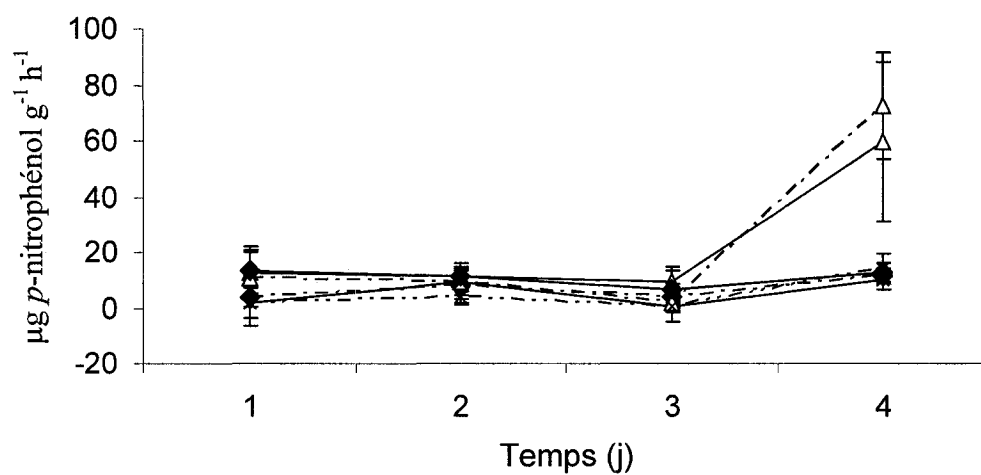


Figure A4- 14 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol *Ma* dans le temps.

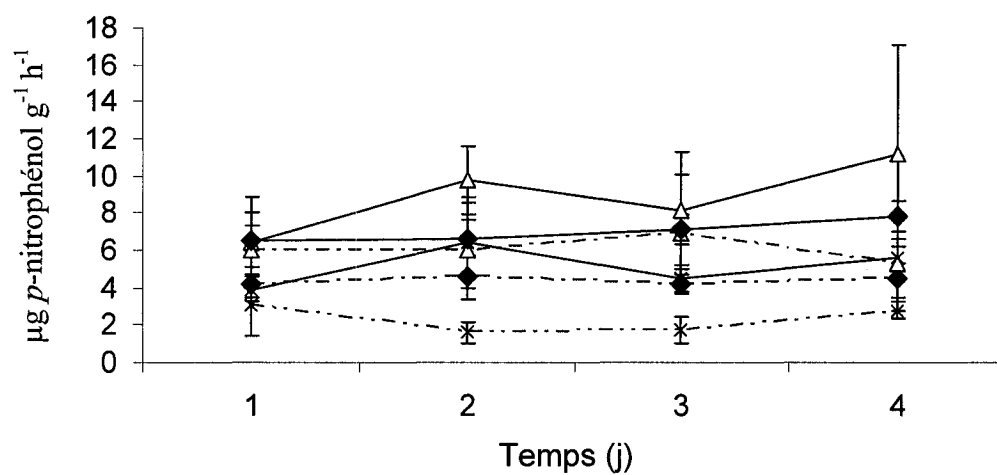


Figure A4- 15 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol *Mn* dans le temps.

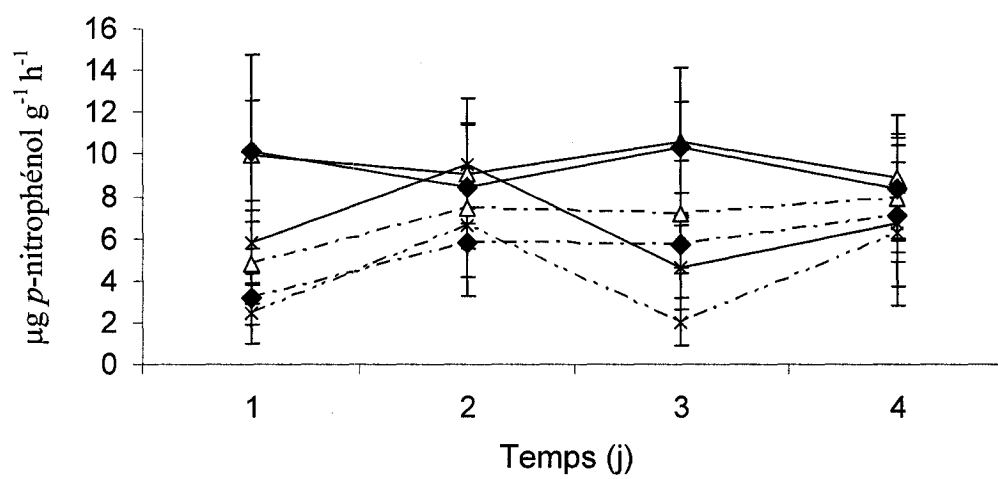


Figure A4- 16 : Courbes d'activité de l'arylsulfatase du sol *Hn* dans le temps.